

530240

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



04 APR 2005



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/033679 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/88,
15/60, C12P 3/00, C12N 15/11, G01N 33/50, C12N 15/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010983

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Oktober 2003 (02.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 46 186.4 3. Oktober 2002 (03.10.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
MAINZ [DE/DE]; Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Werner,
E., G. [DE/DE]; Semmelweisstrasse 12, 65203 Wies-
baden (DE). SCHRÖDER, Heinz [DE/DE]; Hans-Bre-
dow-Strasse 37a, 65189 Wiesbaden (DE). KRASKO,
Anatoli [BY/DE]; Heugasse 2, 55116 Mainz (DE).

(74) Anwälte: KRAUSS, Jan, B. usw.; Boehmert & Boehmert,
Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DECOMPOSITION AND MODIFICATION OF SILICATE AND SILICONE BY SILASE AND USE OF THE RE-
VERSIBLE ENZYME

(54) Bezeichnung: ABBAU UND MODIFIZIERUNG VON SILICATEN UND SILICONEN DURCH SILICASE UND VER-
WENDUNG DES REVERSIBLEN ENZYMS

(57) Abstract: Silicase is an enzyme which can cause amorphous and crystalline silicon dioxide to dissolve, forming free silicic acid. The invention relates to the use of recombinant silicase or silicase isolated from natural sources, and to the use of silicase fusion proteins and carboanhydrase in addition to carboanhydrase-related enzymes for the decomposition, modification and synthesis (reversible silicase reaction) of silicon dioxide (condensation products of silicic acid, silicates), silicones and other silicon (IV) compounds or metal (IV) compounds and the technical use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Silicase ist ein Enzym, das in der Lage ist, die Auflösung von amorphem und kristallinem Siliciumdioxid unter Bildung von freier Kieselsäure zu bewirken. Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von rekombinanter oder aus natürlichen Quellen isolierter Silicase sowie von Silicase-Fusionsproteinen und Carboanhydrase sowie Carboanhydrase-verwandter Enzyme zum Abbau, zur Modifizierung und zur Synthese (reversible Silicase-Reaktion) von Siliciumdioxid (Kondensationsprodukte der Kieselsäure, Silicate), Siliconen und anderen Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindungen und deren technische Verwendung.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/033679 A1

Abbau und Modifizierung von Silicaten und Siliconen durch Silicase und Verwendung des reversiblen Enzyms

Beschreibung

1. Stand der Technik

Silicium ist das zweithäufigste Element der Erdkruste und kommt in verschiedenartigsten Verbindungen vor. Siliciumverbindungen stellen nicht nur die artenreichste Klasse der Mineralien dar, sondern sind auch in wirtschaftlicher Hinsicht bedeutsam. Technisch angewandte, aus Silicaten bestehende Materialien sind beispielsweise Glas, Porzellan, Email, Tonwaren, Zement und Wasserglas. Einige Silicate besitzen katalytische Eigenschaften. Durch teilweisen Austausch der von Silicium eingenommenen Gitterstellen gegen andere Elemente, insbesondere Aluminium, wird die Vielfalt in den möglichen Strukturen und technischen Einsatzmöglichkeiten noch erweitert. So besitzen die Alumosilicate, zu denen die Feldspäte und die Zeolithe gehören, Bedeutung u. a. auf Grund ihrer Molekularsieb- und Ionenaustauschereigenschaften. Weitere Silicium-Verbindungen, wie die Silicone (Siloxane), besitzen u. a. auch medizinische Bedeutung, wie zur Herstellung von Implantaten.

1.1. Siliciumdioxid

Siliciumdioxid (SiO_2) kommt sowohl in kristalliner als auch in amorpher Form vor. Zu den verschiedenen Formen des kristallinen SiO_2 gehören u. a. Quarz, Tridymit und Cristobalit. Achat, Opal und Feuerstein stellen amorphe Siliciumdioxid-Mineralien dar. In allen diesen Erscheinungsformen besitzt Silicium die Koordinationszahl 4 und ist tetraedrisch von vier Sauerstoff-Atomen umgeben.

Aus amorphem SiO_2 bestehen auch die Schalen von Kieselalgen (Diatomeen) und die Nadeln (Spiculae) von Kieselschwämmen.

1.2. Kieselsäuren und Silicate

Das tetraedrisch gebaute $[\text{SiO}_4]^{4-}$ -Ion neigt zur Polymerisation durch Verknüpfung von SiO_4 -Einheiten, wobei jeweils zwei Si-Atome über ein O-Atom miteinander verbunden werden. Durch Kondensation (Wasserabspaltung) entsteht dabei aus der Orthokieselsäure zunächst die Orthodikieselsäure (Pyrokieselsäure; $\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$). Die weitere Kondensation führt über die Polykieselsäuren zu den Metakieselsäuren $[(\text{H}_2\text{SiO}_3)_n]$. Bei kleinerer Zahl der SiO_4 -Einheiten ($n = 3, 4$ oder 6) können sich dabei auch ringförmige Moleküle bilden.

Die wasserlöslichen Salze der Kieselsäuren, die Alkalisilicate, welche beispielsweise durch Schmelzen von Quarz mit Soda, Lauge oder Kaliumcarbonat gewonnen werden, enthalten neben $[\text{SiO}_4]^{4-}$ - auch $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$, $[\text{Si}_3\text{O}_{10}]^{8-}$ - und größere Anionen. Nach Ansäuerung einer solchen Alkalisilicatlösung kondensieren die durch Protonenaufnahme gebildeten Säuremoleküle untereinander zu Polykieselsäuren, wobei die Lösung gelartig wird. Bei weiterem Fortschreiten der Kondensation entstehen aus den zunächst erhaltenen Ketten oder Netzen dreidimensionale Strukturen, welche der Zusammensetzung SiO_2 entsprechen.

Die Silicate lassen sich einteilen in 1.) Silicate mit diskreten Anionen, nämlich 1a.) Insel-Silicate (Ortho-Silicate mit dem Anion $[\text{SiO}_4]^{2-}$; Beispiel: Phenakit, Olivin, Zirkon), 1b.) Gruppen-Silicate (Verknüpfung der SiO_4 -Tetraeder zu kurzkettigen Einheiten; Beispiel: Di-Silicate und Tri-Silicate) und 1c.) Ring-Silicate (ringförmige Verknüpfung der SiO_4 -Tetraeder; Beispiel: Benitoid mit 3-er-Ring, Axinit mit 4-er-Ring und Beryll mit 6-er-Ring), 2.) Ketten-Silicate und Band-Silicate (kettenartig miteinander verbundenen SiO_4 -Tetraedern, die Polymere des Anions $[\text{SiO}_3]^{2-}$ darstellen, und bandförmige Moleküle, die durch Verknüpfung mehrerer SiO_4 -Ketten entstehen; Beispiele: Hornblenden, Asbeste), 3.) Schicht-oder Blatt-Silicate (aus ebenen Schichten von SiO_4 -Tetraeder, die Polymere des Anions $[\text{Si}_4\text{O}_{10}]^{4-}$ darstellen und durch dazwischen gelagerte Kationen zusammengehalten werden; Beispiel: Talk, Kaolinit) und 4.) Gerüstsilicate (Verknüpfung der tetraedrischen SiO_4 -Gruppen zu dreidimensionalen Gittern; Beispiel: verschiedene Modifikationen von Siliciumdioxid wie Feldspäte).

Allgemeine Literatur: Hinz, Silicat-Lexikon (2 Bd.), Berlin: Akademie Verl. 1985; Liebau, Structural Chemistry of Silicates, Berlin: Springer 1985; Petzold und Hinz, Einführung in die Grundlagen der Silicatchemie, Stuttgart: Enke 1979; CD Römpp Chemie Lexikon - Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995.

1.3. Silicone

Durch teilweises Ersetzen der OH-Gruppen der Kieselsäure durch einbindige Organylreste, die sich nicht am Kondensationsvorgang beteiligen, entstehen verschiedene Silicone (Siloxane). Sie werden eingeteilt in: 1.) lineare Polysiloxane (Bautyp: $R_3SiO[R_2SiO]_nSiR_3$), 2.) verzweigte Polysiloxane (mit trifunktionelle oder tetrafunktionelle Siloxan-Einheiten an den Verzweigungsstellen), 3.) cyclische Polysiloxane (aus difunktionellen Siloxan-Einheiten) und 4.) vernetzte Polymere (Verknüpfung von ketten- oder ringförmige Moleküle zu zwei- oder dreidimensionalen Netzwerken).

Silicone sind bedeutsame technische Werkstoffe. Die Viskosität der kettenförmig aufgebauten Silicone (Siliconöle) nimmt mit wachsender Kettenlänge zu. Silicone, die in geringem Maß vernetzt sind, zeigen Kautschuk-Elastizität (Siliconkautschuk), stark vernetzte Ketten sind harzartige (Siliconharze).

1.4. Biomineralisation (Bildung von biogenem Siliciumdioxid) in Kieselschwämmen

Viele Siliciumverbindungen sind nur kostenintensiv herzustellen. Der Prozess der chemischen Synthese der Silicate bedarf oft drastischer Bedingungen wie hoher Druck und hohe Temperatur. Kieselschwämme sind dagegen - ebenso wie Kieselalgen - befähigt, mit Hilfe spezifischer Enzyme Silicatgerüste unter milden Bedingungen, d. h. bei relativ niedriger Temperatur und niedrigem Druck, zu bilden. Weiterhin ist die SiO_2 -Synthese bei diesen Organismen durch hohe Spezifität, Regulierbarkeit und die Möglichkeit der Synthese von definierten Mikrostrukturen (Nanostrukturen) ausgezeichnet.

Die Hauptelemente des Skeletts der Kieselschwämme sind die nadelförmigen Spiculae, die bei der Gruppe der Demospongien (Hornschwämme) und Hexactinellida (Glasschwämme) aus amorphem nichtkristallinem Siliciumdioxid bestehen. Die Demospongien und Hexactinellidae sind die einzigen Metazoen, die Siliciumdioxid anstelle von Calcium in ihrem Skelett besitzen.

Das opale Siliciumdioxid in den Spiculae der Kieselschwämme enthält 6-13% Wasser, was die ungefähre Formel $(\text{SiO}_2)_{2-5} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ergibt (Schwab DW, Shore RE (1971) Mechanism of internal stratification of siliceous spicules. Nature 232:501-502).

Ein Enzym, das bei silicatbildenden Organismen an der Synthese des SiO_2 -Skeletts beteiligt ist, und seine technische Verwendung wurden beschrieben (PCT/US99/30601. Methods, compositions, and biomimetic catalysts, such as silicateins and block copolypeptides, used to catalyze and spatially direct the polycondensation of silicon alkoxides, metal alkoxides, and their organic conjugates to make silica, polysiloxanes, polymetallo-oxanes, and mixed poly(silicon/ metallo)oxane materials under environmentally benign conditions. Inventors/ Applicants: Morse DE, Stucky GD, Deming, TD, Cha J, Shimizu K, Zhou Y; DE 10037270 A 1. Silicatein-vermittelte Synthese von amorphen Silicaten und Siloxanen und ihre Verwendung. Deutsches Patentamt 2000. Anmelder und Erfinder: Müller WEG, Lorenz B, Krasko A, Schröder HC; PCT/EP01/08423. Silicatein-mediated synthesis of amorphous silicates and siloxanes and use thereof. Inventors/Applicants: Müller WEG, Lorenz B, Krasko A, Schröder HC). Dieses Enzym wurde aus dem marinen Kieselschwamm *Suberites domuncula* kloniert (Krasko A, Batel R, Schröder HC, Müller IM, Müller WEG (2000) Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *S. domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. Europ J Biochem 267:4878-4887). Das aus natürlichen Quellen isolierte Enzym ("Silicatein") ist in der Lage, aus organischen Siliciumverbindungen (Alkoxysilanen) amorphes Siliciumdioxid (Polykieselsäuren und Polysilicate) zu synthetisieren (Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD, Morse DE (1999) Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 96:361-365).

Überraschenderweise konnte von den Erfindern - zunächst in dem Meeresschwamm *S. domuncula* als Modellsystem, ein Enzym (genannt: "Silicase") entdeckt werden, das in der Lage ist, sowohl amorphes als auch kristallines Siliciumdioxid aufzulösen.

Dieses Enzym, das am Katabolismus von Siliciumdioxid in Schwämmen beteiligt ist, wurde unter Anwendung der Technik des "Differential Display" der mRNA unter Benutzung des *in vitro* Primmorphe-Zellkultursystems (siehe unten) aufgefunden.

Die Silicase ist in der Lage, zwei Funktionen auszuüben: erstens besitzt sie die Fähigkeit (i) - in Analogie zu der Carboanhydrase - Kalkmaterial aufzulösen und (ii) - und dies war überraschend - auch Siliciumdioxid aufzulösen unter Bildung von Kieselsäure. Deshalb ist die - zuerst in *S. domuncula* aufgefundene - Silicase in der Lage, sowohl beim Katabolismus von kalkhaltigem Material als auch beim Katabolismus der kieselsäurehaltigen Spiculae mitzuwirken.

Neu an der vorliegenden Erfindung ist außerdem, daß das Silicase-Gen durch Erhöhung der Silicium-Konzentrationen im Medium (auf gewöhnlicherweise 60 μM) induziert werden kann (siehe Abbildung 7).

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird allgemein ein Verfahren zum *in vitro* oder *in vivo* Abbau von amorphem oder kristallinem Siliciumdioxid (Kondensationsprodukte der Kieselsäure, Silicate), Siliconen und anderen Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindungen sowie von Mischpolymeren dieser Verbindungen zur Verfügung gestellt, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zum Abbau eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit (siehe Abbildung 3) zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist. Bisher war es nicht bekannt, daß solche Carboanhydrasen-Domänen enthaltende Enzyme in der Lage sind, solche Silikate oder Silicone abzubauen. Aufgrund der Reversibilität dieses Prozesses betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Synthese von amorphem Siliciumdioxid (Kondensationsprodukte der Kieselsäure, Silicate), Siliconen und anderen Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindungen sowie von Mischpolymeren dieser Verbindungen, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zur Synthese

eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß zur Synthese Verbindungen wie Kieselsäuren, Monoalkoxysilantriole, Dialkoxysilandiole, Trialkoxysilane, Tetraalkoxysilane, Alkyl- oder Aryl-Silantriole, Alkyl- oder Aryl-Monoalkoxysilandiole, Alkyl- oder Aryl-Dialkoxysilane, Alkyl- oder Aryl-Trialkoxysilane oder andere Metall(IV)-Verbindungen als Reaktanten (Substrate) eingesetzt werden. Durch Verwendung definierter Mischungen der Verbindungen können Mischpolymere definierter Zusammensetzung hergestellt werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung kann durch das Polypeptid oder ein Metallkomplex des Polypeptids oder die Bindung des Polypeptids oder eines Metallkomplex des Polypeptids an andere Moleküle oder die Oberflächen von Glas, Metallen, Metalloxiden, Kunststoffen, Biopolymeren oder anderen Materialien als Template die Ausbildung definierter zwei- und dreidimensionaler Strukturen erfolgen.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Modifikation einer Kieselsäure oder Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindung enthaltenden Struktur oder Oberfläche zur Verfügung gestellt, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zur Modifikation eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist. Bevorzugterweise liegt die Kieselsäure enthaltende Struktur oder Oberfläche in Form eines Edelsteins oder Halbedelsteins vor.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Modifikation eine Glättung, ein Anätzen oder ein Herstellen von Ausbohrungen der Kieselsäure oder Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindung enthaltenden Struktur oder Oberfläche durch das Polypeptid oder einen Metallkomplex des Polypeptids umfaßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine chemische Verbindung oder Kieselsäure-enthaltende Struktur oder Oberfläche, die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurde, insbesondere in Form eines Edelsteins oder Halbedelsteins.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft auch ein Polypeptid einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt, ein Metallkomplex des Polypeptids, oder Teile davon.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft auch eine Nukleinsäure, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen für ein Polypeptid der Erfindung kodiert. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann in Form einer DNA, cDNA, RNA oder Gemischs davon vorliegen und dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die erfindungsgemäße Nukleinsäure in Form ihrer komplementären „antisense“-Sequenz.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft auch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Form eines (a) Fusionsprotein- (chimäres Protein) Konstrukts, (b) Konstrukts mit getrennter Protein-Expression (Protease-Spaltstelle) oder (c) Konstrukts mit getrennter Protein-Expression (Kassetten-Expression). Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann synthetisch hergestellt worden sein. Verfahren dazu sind im Stand der Technik gut bekannt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors, adenoviralen Vektors oder Partikels, Nanopartikeln oder Liposomen, wobei der Vektor eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält. Weiterhin können Vektoren zum Transfer von Proteinen vorgesehen werden, vorzugsweise in Form eines Nanopartikels oder Liposoms, die ein Polypeptid der Erfindung umfassen.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß der Erfindung, zur Verfügung gestellt. Diese Wirtszelle kann dadurch gekennzeichnet sein, daß sie ein Polypeptid nach Anspruch 1, einen Metallkomplex des Polypeptids oder Teile davon exprimiert. Als Wirtszellen eignen sich alle bekannten Wirtszell-Organismen, so u.a. Hefen, Pilze, Schwämme, Bakterien, CHO-Zellen oder Insektenzellen.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es synthetisch hergestellt worden ist oder daß das Polypeptid oder der Metallkomplex des Polypeptids in einem prokaryotischen oder eukaryotischen Zellextrakt oder -lysat vorliegt. Der Zellextrakt oder das Lysat kann aus einer Zelle ex vivo oder ex vitro gewonnen werden, zum Beispiel einer rekombinanten bakteriellen Zelle oder einem Meeresschwamm.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann nach herkömmlichen im Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt werden und somit im wesentlichen frei von anderen Proteinen vorliegen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Auffindung von Inhibitoren oder Aktivatoren eines Polypeptids einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einem dazu homologen Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt, wobei a) ein Polypeptid einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt zur Verfügung gestellt wird, b) das Polypeptid aus Schritt a) mit einem potentiellen Inhibitor oder Aktivator in Kontakt gebracht wird, und c) die Fähigkeit des Polypeptids gemessen wird, Silikate oder Silicone abzubauen oder zu synthetisieren. Mit diesem Verfahren lassen sich wertvolle Substanzen aufspüren, die sich unter Umständen als Therapeutika eignen (dazu siehe im folgenden). Verfahren zur Auffindung solcher Substanzen sind dem Fachmann bekannt und schließen z.B. die Verwendung von radioaktiv markierten oder enzymatisch markierten Kandidaten-

Verbindungen ein. Verfahren zur Messung der Aktivität der Silicase sind im folgenden beschrieben und können leicht durch den Fachmann auf ein Testformat hin angepaßt werden. Ein Inhibitor verringert dabei die Aktivität des Enzyms im wesentlichen vollständig, ein Aktivator induziert eine Aktivität oder verstärkt diese über den Ausgangsspiegel.

Gemäß einer Alternative des Verfahrens kann das Polypeptid einer Silicase aus *Suiberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt *in vivo*, in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Zellextrakt oder -lysat oder in gereinigter Form für den Test zur Verfügung gestellt wird.

Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend a) Auffinden eines Inhibitors oder Aktivators nach Anspruch 25 oder 26 und b) Mischen des wie oben angegeben aufgefundenen Inhibitors oder Aktivators mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Hilfsstoff. Mittels dieser Zusammensetzung werden wertvolle Pharmazeutika zur Verfügung gestellt, die, wie das Polypeptid oder eine Nukleinsäure der Erfindung zur Prävention oder Therapie der Silikose verwendet werden können. Bevorzugt ist eine Verwendung, wobei die Prävention und Therapie der Silikose durch Auflösen von Quarzkristallen erfolgt. Weiterhin kann die Verwendung eines Polypeptids oder einer Nukleinsäure oder pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der Erfindung zur Resorption oder zur Modulation der Resorbierbarkeit von Siliconen und Silicon-Implantaten erfolgen. Schließlich läßt sich die vorliegende Erfindung auch zur Transfektion von Zellen mit erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur Resorption oder zur Modulation der Resorbierbarkeit von Siliconen und Silicon-Implantaten verwenden. Die oben genannten Verwendungen und die Verfahren dazu sind dem Fachmann bekannt und können leicht auf die hier vorhandenen Bedürfnisse und Anforderungen angepaßt werden.

1.5. Klonierung des die Silicase codierenden Gens

Unter Anwendung der Technik des "Differential Display" wurde eine cDNA identifiziert, die für eine Carboanhydrase codiert. Bei Carboanhydrasen war bisher lediglich eine Beteiligung an der pH-Regulation, der HCO_3^- -Reabsorption und der CO_2 -Expiration bekannt, nicht jedoch eine Beteiligung an der - bisher unbekannten - enzymatischen Auflösung von Siliciumdioxid-Materialien.

Die für die Silicase aus dem Meeresschwamm *S. domuncula* codierende cDNA (genannt: *SDS/A*) sowie das aus der Nucleotidsequenz abgeleitete Polypeptid (genannt: *SIA_SUBDO*) besitzen folgende Eigenschaften. Länge der cDNA: 1395 Nucleotide (nt); offenes Leseraster: von nt₁₂₂ - nt₁₂₄ bis nt₁₂₅₉ - nt₁₂₆₁ (Stoppcodon); Länge des Polypeptids: 379 Aminosäuren; relative Molekülmasse (M_r) des Polypeptids: 43131; isoelektrischer Punkt (pI): 6,5 (berechnet mit: PC/GENE (1995) Data Banks CD-ROM; Release 14.0. IntelliGenetics, Inc. Mountain View, CA).

Die Northern-Blot-Analyse mit dem Schwamm *SDS/A*-Klon als Sonde ergibt eine Bande von $\approx 1,5$ kb.

Abbildung 2 (unten) zeigt die Nucleotidsequenz der - mit Hilfe der Differential-Display-Technik identifizierten - Schwamm-Silicase-cDNA und Abbildung 2 (oben und unten) sowie Abbildung 3A zeigen das aus der Nucleotidsequenz abgeleitete Polypeptid der Schwamm-Silicase (*SIA_SUBDO*).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Schwamm-Silicase besitzt eine große Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen der Carboanhydrase-Familie. Bis jetzt wurden mehr als sieben Isoenzyme der Carboanhydrasen bei Menschen identifiziert (Sun MK, Alkon DL (2002) Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. Trends Pharmac Sci 23:83-89). Der "Expect value" $[E]$ (Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (2000) Current protocols in protein science. John Wiley & Sons, Chichester) der Schwamm-Silicase mit der humanen Carboanhydrase II (*CAH2_HUMAN*; P00918) beträgt $2e^{-29}$. Die Eukaryonten-Typ-Carboanhydrase-Domäne (PFAM00194 [www.ncbi.nlm.nih.gov]) wird bei der Schwamm-Silicase im Aminosäure-Bereich von aa₈₇ bis aa₃₃₅ gefunden (Abbildung 3A). Das Alignment der Schwamm-Silicase mit der humanen Carboanhydrase II zeigt, daß die meisten der charakteristischen Aminosäuren, welche die Eukaryonten-

Typ-Carboanhydrase-Signatur bilden (Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Yuri K, Onishi S (1999) cDNA sequence, mRNA expression, and chromosomal localization of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP XI. *Biochim Biophys Acta* 1431:518-524; Okamoto N, Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taniuchi K, Onishi S (2001) cDNA sequence of human carbonic anhydrase-related protein CA-RP X and XI in human brain. *Biochim Biophys Acta* 1518:311-316), auch in der Schwamm-Silicase vorhanden sind. Bei der Schwamm-Sequenz sind jedoch die Aminosäurereste 192 (Alanin), 205 (Phenylalanin) und 207 (Phenylalanin) ersetzt (Abbildung 3A).

Die Carboanhydrasen bilden eine Familie von Zinkmetall-Enzymen, die an der reversiblen Hydratation von CO₂ beteiligt sind (Sly WS, Hu PY (1995) Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* 64:375-401). Die drei konservierten Histidinreste werden in der Silicase bei den Aminosäuren aa₁₈₁, aa₁₈₃ und aa₂₀₆ gefunden (Abbildung 3A).

1.6. Phylogenetische Analyse der Silicase

Abbildung 3B zeigt die Position der Schwamm-Silicase unter verschiedenen, ausgewählten Vertretern der Carboanhydrase-Familie (phylogenetischer Baum; "rooted tree" mit der bakteriellen Carboanhydrase-Sequenz von *Neisseria gonorrhoeae*). Die Schwamm-Silicase bildet mit der Carboanhydrase von *Caenorhabditis elegans* die Basis für die Carbonanhydrasen der anderen Metazoen. Die Metazoen-Enzyme sind von den Pflanzen-Enzymen und auch von den bakteriellen Enzymen getrennt.

2. Herstellung der Silicase

Die Silicase kann aus Geweben oder Zellen gereinigt oder rekombinant hergestellt werden.

2.1. Reinigung der Silicase aus natürlichen Quellen

Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Zur Reinigung der Silicase (oder Carboanhydrase oder Carboanhydrase-verwandtes Enzym) wird das - beispielsweise in einem Tris-SO₄ / Natriumsulfat-Puffer (pH 8,7) - homogenisierte Gewebe (oder wer-

den die in diesem Puffer homogenisierten Zellen) zentrifugiert und zu dem erhaltenen Überstand eine Affinitätschromatographie-Matrix wie beispielsweise CM-Bio-Gel A, gekoppelt mit *p*-Aminomethylbenzolsulfonsäureamid, hinzugegeben. Danach wird die Suspension auf einem Rotationsschüttler (beispielsweise für 24 h) inkubiert. Das Affinitätsgel wird dann durch Absaugen über einen Glasfilter gesammelt und mit einem Puffer (beispielsweise 0,1 M Tris-SO₄, pH 8,7, enthaltend 0,2 M Na₂SO₄, 1 mM Benzamidin und 20% Glycerin) gewaschen. Danach ist es zweckmäßig, einen zweiten Waschschrift mit demselben Puffer bei einem niedrigeren pH (beispielsweise pH 7,0) anzuschließen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das Gel wird dann in eine Säule überführt und mit demselben Puffer (pH 7,0) gewaschen. Zur Elution des Enzyms kann beispielsweise ein 0,1 M Tris-SO₄-Puffer, pH 7,0, enthaltend 0,4 M NaN₃, 1 mM Benzamidin und 20% Glycerin, benutzt werden. Das eluierte Enzymprotein wird dann beispielsweise gegen einen 10 mM Tris-SO₄-Puffer, pH 7,5, enthaltend 1 mM Benzamidin, dialysiert und danach auf eine Ionenaustauschersäule (beispielsweise DEAE-Sephacel) gegeben, die beispielsweise mit 10 mM Tris-SO₄, pH 7,5, äquilibriert worden ist. Nach dem Waschen mit demselben Puffer wird das Enzym durch Anlegen eines linearen Salz-Gradienten (beispielsweise 0 bis 0,1 M Na₂SO₄) eluiert und gesammelt. Mit Hilfe dieser Prozedur kann die Silicase unter anderem aus dem Schwamm *S. domuncula* gereinigt werden.

2.2. Herstellung der rekombinanten Silicase

2.2.1. Clonierung der cDNAs aus marinen Schwämmen

Die Durchführung der Technik des "Differential Display" der mRNA/Transkripte ist Stand der Technik (Müller WEG, Krasko A, Skorokhod A, Bünz C, Grebenjuk VA, Steffen R, Batel R, Müller IM, Schröder HC (2002) Histocompatibility reaction in the sponge *Suberites domuncula* on tissue and cellular level: central role of the allograft inflammatory factor 1. Immunogenetics 54, 48-58). Gesamt-RNA wird von Kontrollkulturen (gehalten bei einer niedrigen Silicium-Konzentration von 5 µM) sowie von in Gegenwart von 60 µM Silicium behandelten Kulturen unter Benutzung von TRIzol Reagens (GibcoBRL) isoliert. Die Synthese des ersten cDNA-Stranges wird mit "anchored" oligo(dT)-Primern und AMV Reverser Transkriptase nach den Vorschriften des Herstellers (Promega) durchgeführt. Nach der Synthese des ersten Stranges wird die resultierende cDNA zehnfach mit H₂O verdünnt und ein aliquotes Teil davon

(2 µl) der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unterworfen. Die Reaktion wird in einem Volumen von 20 µl nach Zugabe des "arbitrary" Primers 1 (5'-GTGATCGCAG-3') oder 2 (5'-CTTGATTGCC-3') sowie von 2 µM dNTP, T₁₁GC, 5 Units BioTherm Polymerase (Genecraft) und [α -³²P] dATP durchgeführt. Folgende Reaktionsbedingungen haben sich bei der PCR als geeignet erwiesen: initiale Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, dann 40 Amplifizierungszyklen bei je 95°C für 20 Sekunden, 42°C für 120 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden, gefolgt von einer Endinkubation von 10 Minuten bei 72°C. Die Proben werden dann in einem 5%igen Polyacrylamidgel (in 1 x TBE) aufgetrennt. Nach dem Lauf wird das Gel getrocknet und 4 Tage mit einem Röntgenfilm exponiert. Die interessierenden, im Autoradiogramm detektierten Banden werden ausgeschnitten, 15 Minuten in 200 µl H₂O gekocht, auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Die resultierenden Überstände werden mit dem gleichen Volumen an 10 M Ammoniumacetat, 20 µg/ml tRNA versetzt und mit 2,5 Volumina an Ethanol bei -80°C über Nacht präzipitiert. Die cDNA-Pellets werden dreimal in 75% Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O gelöst.

Etwa 2 µl der eluierten Banden werden in 50 µl-Reaktionsansätzen unter Benutzung der oben beschriebenen Primer unter denselben Bedingungen reamplifiziert, in einem pGEM-T-Vector (Promega) subcloniert und sequenziert.

Diejenigen Transkripte werden ausgewählt, die differentiell exprimiert werden, d. h. die zusätzlich in den Gelen mit den RNAs von Zellen erhalten werden, die mit 60 µM Silica behandelt wurden (Abbildung 1). Die identifizierten cDNAs/Transkripte werden mit den in der BLAST Data Base enthaltenen Sequenzen verglichen. In dem in Abbildung 1 gegebenen Beispiel zeigten die folgenden Moleküle die größte Verwandtschaft: Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM Kinase) II gamma (XM_044349; Expect value [E]: 1e⁻¹⁶); hypothetisches Protein (XP_101359, E 1,6); MUC3B Mucin (AJ291390, E 0,20); hypothetisches Protein (XP_067115, E 5,9); hypothetisches Protein (XP_090138, E 2,9); ATP-bindende Kasette, Unterfamilie A Mitglied 4 (XM_001290, E 1,6); Polypeptid ähnlich dem Zinkfingerprotein 91 (XM_091947, E 3,1); hypothetisches Protein (XP_104250, E 0,48), hypothetisches Protein (XP_169372, E 8,6); hypothetisches Protein (XP_104250, E 4,1), hypothetisches Protein (XP_098020, E 3,3) und hypothetisches Protein (XP_169372, E 8,6).

Zusätzlich zu diesen Sequenzen wurde die Silicase als weiteres Transkript identifiziert und in größerem Detail analysiert.

Das Silicase-Gen kann auch aus cDNA-Bibliotheken, z. B. in *ZapExpress* und in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF', mit geeigneten degenerierten Primern mittels der PCR-Technik identifiziert werden; hierzu werden entsprechende vektorspezifische Primer eingesetzt. Die erhaltenen Syntheseprodukte werden zum Screenen in den betreffenden cDNA-Bibliotheken benutzt. Danach werden die identifizierten Clone in einen Vektor (beispielsweise *pGem-T*) subcloniert und anschließend sequenziert.

2.2.2. Expression und Isolierung der rekombinanten Silicase

Die Herstellung der rekombinanten Silicase (genannt: rSIA_SUBDO) erfolgt bevorzugt in *E. coli*. Aber auch die Herstellung in Hefen und Säugerzellen ist möglich und wurde erfolgreich durchgeführt. Im Folgenden ist als Beispiel die Expression des *SDSIA*-Gens von *S. domuncula* in *E. coli* unter Benutzung des "GST (Glutathion-S-Transferase) Fusions"-Systems (Amersham) beschrieben. In dem Beispiel werden zwei Inserte benutzt, um potentielle Effekte von Signalpeptiden während der Expression zu eliminieren; ein Insert umfaßt das gesamte abgeleitete Protein (lange Form; von der Aminosäure aa₁ bis zur Aminosäure aa₃₇₉) und das andere Insert lediglich die Aminosäuren aa₉₆ bis aa₃₇₉ (kurze Form) (Abbildung 3A). Die entsprechenden Klone werden als *SDSIA-l* und *SDSIA-s* bezeichnet. Sie werden in einen entsprechenden Vektor eincloniert, z. B. in das Plasmid *pGEX-4T-2*, welches das Glutathion S-Transferase (GST)-Gen von *Schistosoma japonicum* enthält. Auch andere Expressionsvektoren haben sich als geeignet erwiesen. Nach Transformation von *E. coli* wird die Expression der Silicase üblicherweise durch IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert und in Gegenwart von 1 mM ZnSO₄ für 4 oder 6 Stunden bei 37°C durchgeführt (Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidmann JG, Struhl K (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York). Die erhaltenen GST-Fusionsproteine mit der Bezeichnung rSIA_SUBDO-l (lange Form; Mr 69 kDa) bzw. rSIA_SUBDO-s (kurze Form; Mr 58 kDa) werden z. B. durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B gereinigt. Zur Abtrennung der Glutathion-S-transferase von der rekombinanten Schwamm-Silicase werden die Fusionsproteine mit Thrombin (10 Units/mg) gespalten. Die Proteine werden dann der Gelelektrophorese in Gegenwart

von 2-Mercaptoethanol unterworfen. Die Gelelektrophorese kann in 10%igen Polyacrylamidgelen mit 0,1% NaDodSO₄ (PAGE) durchgeführt werden. Die Gele werden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Nach der Spaltung, Reinigung und anschließender PAGE werden die lange Form (rSIA_SUBDO-l [43 kDa]) und die kurze Form (rSIA_SUBDO-s [32 kDa]) der rekombinanten Proteine erhalten (Abbildung 4).

2.2.3. Expression und Isolierung der rekombinanten Silicase aus weiteren Organismen

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise kann die Isolierung, Clonierung und Expression der Silicase-cDNA auch aus anderen Organismen durchgeführt werden, beispielsweise aus (Siliciumdioxid-produzierenden) Diatomeen (z. B. *Cylindrotheca fusiformis*). Die Gewinnung von Diatomeen in axenischen Kulturen ist Stand der Technik (Kröger N, Bergsdorf C, Sumper M (1996) Europ J Biochem 239:259-264).

2.3. Isolierung und Reinigung der Silicase mittels Antikörper

Nach Extraktion oder partieller Reinigung nach einem der oben geschilderten Verfahren wird die Silicase an einer Antikörper-Affinitätsmatrix gereinigt. Die Affinitätsmatrix wird hergestellt, indem ein Silicase-spezifischer Antikörper an eine feste Phase (CNBr-aktivierte Sepharose oder anderer geeigneter Träger) immobilisiert wird. Als Antikörper werden monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen das Silicase eingesetzt, die nach Standard-Methoden hergestellt werden (Osterman LA (1984) Methods of Protein and Nucleic Acid Research, Vol 2, Springer-Verlag, Berlin). Die Kopplung des Antikörpers an die Säulenmatrix wird nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia) durchgeführt. Die Elution der reinen Silicase erfolgt mittels pH-Änderung oder Änderung der Ionenstärke.

3. Nachweis der Silicase-Aktivität

Im Folgenden werden lediglich die Aktivitäten, die für die kurze Form der rekombinanten Schwamm-Silicase (rSIA_SUBDO-s) gefunden werden, angegeben.

3.1. Carboanhydrase-Aktivität

Zur Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität der rSIA_SUBDO-s kann ein Assay angewandt werden, der auf der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat basiert (Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT (1966) Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. J Biol Chem 241:5137-5149). 0,5 ml einer 3 mM *p*-Nitrophenylacetat-Lösung (Sigma) wird mit 0,05 ml eines 0,3 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7,6) gemischt. Nach Präinkubation bei 25°C für 5 Minuten werden 50 µl der rekombinanten Silicase (rSIA_SUBDO) hinzugefügt, und der Anstieg der Extinktion bei 348 nm wird über einen Zeitraum von 5 Minuten bestimmt.

Abbildung 5 zeigt, daß die Aktivität der rekombinanten Silicase von der Konzentration des Enzyms im Assay abhängt. Die Enzymaktivität wird in optische Dichte (OD)-Einheiten pro Minute angegeben. Der Zusatz von 1 µg Silicase pro Assay (0,56 µl) ergab eine Aktivität von 0,005 OD_{348nm}, die mit steigender Proteinkonzentration bis auf 0,04 OD_{348nm} anstieg.

3.2. Silicase-Aktivität

Als Substrat (amorphes Siliciumdioxid) für die Silicase können beispielsweise Spiculae von *S. domuncula* dienen. Die Spiculae können aus Schwammgewebe durch 12-stündige Inkubation in Gegenwart von Ethylendiamintetraessigsäure (20 mM, in PBS; PBS = Phosphatpuffer-Salz-Lösung, bestehend aus 1,15 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl) erhalten werden. Nach Waschen mit destilliertem Wasser und mit Ethanol (zweimal) werden die Spiculae getrocknet (56°C) und dann in einem Mörser zu einem Pulver zerrieben.

Die Silicase-Aktivität kann wie folgt bestimmt werden. Üblicherweise werden 100 µg der getrockneten Spiculae (Pulver) zu einem geeigneten Puffer wie 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,2; 10 mM DL-Dithiothreitol, 100 mM NaCl) und 0,5 mM ZnSO₄ in 2 ml Eppendorf-Gefäßen hinzugegeben. Dann werden üblicherweise 50 µl der rekombinanten Silicase hinzugefügt und bei 25°C inkubiert (die Inkubation ist auch bei anderen Temperaturen zwischen 5°C und etwa 65°C möglich). Die durchschnittliche Inku-

bationszeit beträgt 60 Minuten. Zur quantitativen Bestimmung der Menge an gelöstem Siliciumdioxid werden die nichtgelösten Spiculae abzentrifugiert (14000 x g; 15 Minuten; 4°C). Die freigesetzte, lösliche Kieselsäure kann z. B. mit Hilfe eines Molybdat-gestützten Nachweisverfahrens, wie z. B. dem kolorimetrischen "Silicon Test" (Merck; 1.14794), quantitativ bestimmt werden. Die Menge an Kieselsäure wird in diesem Fall anhand einer Kalibrierungskurve mit einem Siliciumstandard (Merck 1.09947) aus den Extinktionswerten bei 810 nm berechnet.

Abbildung 5 zeigt, daß die rekombinante Silicase den Abbau (Auflösung) von amorphem Siliciumdioxid katalysiert. Üblicherweise werden bei einer Enzym-Konzentration von 1 µg rekombinante Silicase pro Assay 3 ng Kieselsäure/Assay freigesetzt. Bei höheren Proteinkonzentrationen (3 oder 10 µg/Assay) beträgt die Freisetzung von Kieselsäure 20 bzw. 43 ng/Assay.

3.3. Silicase-Aktivität in *Escherichia coli*-Lysat

Die Silicase-Aktivität ist auch in Lysaten von *E. coli* nachweisbar, die mit dem *SDSIA*-Gens von *S. domuncula* (in dem folgenden Beispiel wurde die kurze Form verwendet; = *SDSIA-s*) unter Benutzung des "GST Fusions"-Systems transformiert wurden. Bei dem in Tabelle 1 gezeigten Experiment wurden Schwamm-Spiculae (Nadeln; 1 mg) mit 1,5 ml Lysat, dem 1 mM $ZnCl_2$ und 0,1 M NaCl hinzugefügt wurden, bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach 1, 3, 6 und 24 h wurden die Proben durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturiert (zur Inaktivierung der Silicase) und dann mit Proteinase K (30 Units/ml) bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (5 min, 14000 rpm) und der Molybdat-Assay (Kit der Firma Merck; siehe oben) zur Bestimmung des freigesetzten Silicats durchgeführt. Es wurde gefunden, daß bei 4°C nur eine sehr geringfügige Menge an Silicat freigesetzt wurde, bei Raumtemperatur (22°C) und 56°C jedoch bis zu 3,4 bzw. 4,1 ng/ml (24 h).

Eine etwas geringere Menge an freigesetztem Silicat ließ sich auch in Lysaten aus nichttransformierten *E. coli* nachweisen, was zeigt, daß auch in bakteriellen Zellextrakten eine deutliche Silicat-abbauende Aktivität vorhanden ist.

Tabelle 1. Silicase-Aktivität in Lysaten von transformierten (+) und nichttransformierten (-) *E. coli* bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Zur Transformation wurde die kurze Form des *SDSIA*-Gens von *S. domuncula* (= *SDSIA-s*) verwendet. Die Freisetzung von Silicat wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 3, 6 und 24 Stunden bestimmt.

Temperatur	Freigesetztes Silicat (ng/ml)			
	1h	3h	6h	24h
4°C (-)	0,113	0,124	0,242	0,303
4°C (+)	0,110	0,140	0,526	0,828
22°C (-)	0,197	0,415	1,467	2,068
22°C (+)	0,528	0,540	1,939	3,409
56°C (-)	0,345	1,009	1,824	2,447
56°C (+)	1,542	1,747	2,275	4,092

3.4. Silicase-Aktivität kommerzieller Carboanhydrasen

Silicase-Aktivität ist nicht nur bei dem Schwammenzym, sondern überraschenderweise auch bei kommerziellen Carboanhydrasen meßbar. Tabelle 2 zeigt die Freisetzung von Silicat aus Diatomeen-Skeletten (Silicat-Gerüsten von Kieselalgen) sowie aus Sand durch eine kommerzielle Carboanhydrase-Präparation (aus Rinder-Erythrozyten; Firma Calbiochem). In dem Experiment wurden die Silicat-Proben zunächst zweimal mit Wasser und zweimal mit Äthanol gewaschen und danach getrocknet. Anschließend wurden die Proben in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, suspendiert (1 mg/ml) und in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt (100 µl pro Reaktionsgefäß; = 100 µg Silicat pro Reaktionsgefäß). Danach wurde 1,4 ml bovine Carboanhydrase (10 Units; Firma Calbiochem) in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 (mit und ohne 1 mM ZnCl₂) pro Reaktionsgefäß hinzugefügt. Die Gefäße wurden bei Raumtemperatur (22°C) unter Schütteln für 24 h inkubiert. Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (14000xg, 15 min, 4°C). Der Silicat-Gehalt im Überstand wurde mit Hilfe des Molybdat-Assay der Firma Merck (siehe oben) bestimmt.

Tabelle 2. Silicase-Aktivität einer kommerziellen Carboanhydrase-Präparation (Firma Calbiochem) mit und ohne Zusatz von ZnCl_2 . Die Freisetzung von Silicat wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bestimmt.

	Freigesetztes Silicat (ng/ml)	
	Diatomeen	Sand
Minus ZnCl_2	0,0018	0,0036
Plus ZnCl_2	0,0233	0,0359

3.5. Reversibilität der Silicase-Aktivität

Die Silicase-Reaktion ist prinzipiell reversibel. Deshalb kann die Reaktion auch zur Synthese von amorphem Siliciumdioxid oder Siliconen verwendet werden. Für die Silicase-vermittelten Synthese können auch Alkyl- oder Aryl-substituierte Alkoxyverbindungen von Silicium(IV) wie Tetraalkoxysilane, Trialkoxysilane, Dialkoxysilandiole, Monoalkoxysilantriole, Alkyl- oder Aryl-Trialkoxysilane, Alkyl- oder Aryl-Dialkoxysilane oder Alkyl- oder Aryl-Monoalkoxysilandiole eingesetzt werden. Auch Mischungen dieser Substrate werden polymerisiert. Somit können auch Mischpolymere hergestellt werden.

4. Ligation der cDNA für Silicase mit einer oder mehreren cDNA(s) für anderer Proteine

4.1. Herstellung von Silicase-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der Silicase wird ein geeigneter Expressionsvektor (beispielsweise *pQE-30*-Vektor; Qiagen) eingesetzt. Die Silicase-cDNA - mit z. B. einer *Bam*HI-Restriktionsstelle am 5'-Terminus und z. B. einer *Sal*I-Restriktionsstelle am 3'-Terminus - wird hergestellt. Das Stopp-Codon in der Silicase-cDNA wird entfernt. Hierzu wird die PCR-Technik eingesetzt und zum Amplifizieren Primer, welche die betreffenden Restriktionsstellen besitzen, benutzt. Die cDNA für das zweite Protein wird entsprechend gewonnen, wobei am 5'-Terminus die gleiche Schnittstelle wie am 3'-Terminus der Silicase-cDNA (im Beispiel *Sal*I) und am 3'-

Terminus eine von den anderen verschiedene (z. B. eine *HindIII*-Stelle) vorliegt. Falls sich in den betreffenden cDNAs interne Restriktionsstellen befinden, können alternative Restriktionsenzyme eingesetzt werden. Darüber hinaus können auch Linker zwischen die beiden cDNAs eingesetzt werden.

Die beiden cDNAs werden nach den üblichen Verfahren ligiert, gereinigt und in den *pQE-30*-Vektor einligiert. Die Ligation erfolgt im Anschluß an das Histidin-Tag (etwa 6 Histidin-Codons). Die Expression und Reinigung des Fusionsproteins über z. B. das Histidin-Tag, das an dem rekombinanten Protein vorliegt, kann an entsprechenden Affinitätssäulen, z. B. einer Ni-NTA-Matrix, durchgeführt werden (Skorokhod A, Schäcke H, Diehl-Seifert B, Steffen R, Hofmeister A, Müller WEG (1997) *Cell Mol Biol* 43:509-519).

4.2. Getrennte Expression I (Protease-Spaltstelle)

Alternativ zu dem Verfahren unter 4.1. kann zwischen der cDNA für die Silicase und der cDNA für ein weiteres Protein eine Protease-Spaltstelle (wie z. B. eine Enterokinase-Stelle) eincloniert werden. In diesem Falle kann ein Codon für ein neues Start-Methionin vor den codierenden Bereich des Gens für das weitere Protein insertiert werden. Nach Expression und Reinigung wird das Fusionsprotein proteolytisch gespalten. Jetzt liegen beide Proteine separat vor.

4.3. Getrennte Expression II (Kassetten-Expression)

Alternativ können beide Proteine auf einem Konstrukt separat exprimiert werden. Hierzu wird in einem Expressions-Vektor das Silicase-Gen dem His-Tag nachgeschaltet. Am Ende der Silicase-cDNA wird ein Stopp-Codon insertiert. Zwischen der cDNA für die Silicase und der cDNA für das weitere Protein wird eine Ribosomen-Bindungsstelle mit Codon für ein Start-Methionin eincloniert. Wiederum wird ein His-Tag der cDNA für das weitere Protein vorgeschaltet. Ebenfalls erhält dieses Gen ein Stopp-Codon.

Die His-Tags können deletiert werden, wenn die Proteine zur Funktionsanalyse in den betreffenden Wirtszellen benutzt werden.

4.4. Erweiterungen

Für die unter 4.1 bis 4.3 beschriebene Expression können sowohl bakterielle als auch eukaryotische Zellen benutzt werden.

Die unter 4.1 bis 4.3 beschriebene Expression kann auch für drei und mehr offene Leserahmen eingesetzt werden.

5. Das Modellsystem für die Synthese/den Abbau von biogenem Siliciumdioxid: Primmorphe

5.1. Primmorphe

Das Primmorphe-System wurde zum Patent angemeldet (**DE 19824384**. Herstellung von Primmorphe aus dissoziierten Zellen von Schwämmen, Korallen und weiteren Invertebraten: Verfahren zur Kultivierung von Zellen von Schwämmen und weiteren Invertebraten zur Produktion und Detektion von bioaktiven Substanzen, zur Detektion von Umweltgiften und zur Kultivierung dieser Tiere in Aquarien und im Freiland. Erfinder und Anmelder: Müller WEG, Brümmer F).

Primmorphe sind Aggregate, die aus proliferierenden und differenzierenden Zellen bestehen (Müller WEG, Wiens M, Batel R, Steffen R, Borojevic R, Custodio MR (1999) Establishment of a primary cell culture from a sponge: Primmorphs from *Suberites domuncula*. Marine Ecol Progr Ser 178:205-219). Primmorphe werden aus Schwamm-Einzellzellen, die aus Schwammgewebe nach Dissoziation in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem, EDTA enthaltendem künstlichem Seewasser erhalten werden, gebildet. Aus den Schwamm-Einzellzellen bilden sich nach Überführung in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -enthaltendes Seewasser Aggregate, die nach 3 Tagen eine Größe von 1 mm erreichen, und nach 5 Tagen Primmorphe mit einem Durchmesser von etwa 5 mm.

Die Primmorphe werden von epithelartigen Zellen, den Pinacocyten, umgeben. Die Zellen innerhalb der Primmorphe sind überwiegend sphäkulöse Zellen, daneben kommen Amoebycyten und Archaeocyten vor.

5.2. Effekt von Silicium auf die Spiculae-Bildung

Das Primmorphe-System von Schwämmen, z. B. *S. domuncula*, kann zur Untersuchung der Spiculae-Bildung oder -Auflösung benutzt werden.

Dazu werden Primmorphe für 8 Tage in Seewasser, das mit 30 μM Fe(+++) (hinzugegeben als Citrat) und 10% RPMI1640-Medium ergänzt wird, kultiviert. Die Silicium-Konzentration im Seewasser/Medium ist 5 μM . Nach 8 Tagen werden die Primmorphe entweder in diesem Medium weiter inkubiert oder in ein Medium, das 60 μM Silicium enthält (die für die Spiculae-Bildung optimale Silicium-Konzentration; hinzugegeben als Na-Hexafluorosilicat), überführt und für 1 oder 3 Tage kultiviert.

Primmorphe, die ohne Zugabe von Silicium kultiviert werden, zeigen überwiegend eine runde, sphärische Gestalt.

Abbildung 6A zeigt, daß die meisten der Primmorphe nach zusätzlicher 3-tägiger Kultivierung in Gegenwart von 60 μM Silicium jedoch ovalförmig werden. In Gegenwart von Silicium beginnen die Primmorphe mit der Spiculae-Bildung. Teilweise kann die Synthese von langen (>100 μm) Spiculae beobachtet werden (Abbildung 6B), meist werden jedoch kleinere Spiculae (30 μm) gefunden (Abbildung 6D). In Abwesenheit von Silicium sind keine Spiculae vorhanden (Abbildung 6C).

5.3. Silicium-responsive Gene

In Primmorphen von *S. domuncula* wird in Gegenwart von Silicium die Expression des Silicase-Gens hochreguliert. Daneben wird auch die Expression der folgenden Gene erhöht: Silicatein, Kollagen, Myotrophin und Isocitrat-Dehydrogenase.

Die Expression des Silicase-Gens kann durch Northern-Blotting unter Anwendung von Methoden, die Stand der Technik sind und beispielsweise zur Bestimmung der Expression von Silicatein und Kollagen angewandt wurden, bestimmt werden (Kras-ko A, Batel R, Schröder HC, Müller IM, Müller WEG (2000) Expression of silicatein

and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Europ J Biochem* 267:4878-4887).

In dem in Abbildung 7 gezeigten Experiment blieben die Primmorphe entweder unbehandelt oder wurden mit 60 μM Silicium für 1 bis 3 Tage inkubiert. Die RNA wurde dann extrahiert. Eine Menge von je 5 μg Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch an einem 1%igen Formaldehyd/Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Hybond-N⁺ Nylon-Membran entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Amersham) geblottet. Die Hybridisierung wurde mit 400 bis 600 bp großen Segmenten der folgenden Sonden durchgeführt: *SDSIA* (codiert für Silicase), *SDSILICA* (codiert Silicatein) und *SDIDH* (codiert für die α -Untereinheit der Isocitrat-Dehydrogenase). Die Sonden wurden mit dem PCR-DIG-Probe-Synthesis Kit entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Roche) markiert. Nach dem Waschen wurde die DIG-markierte Nucleinsäure mit anti-DIG Fab Fragmenten (konjugiert mit alkalischer Phosphatase; Verdünnung: 1:10000) detektiert und mit Hilfe der Chemolumineszenztechnik unter Verwendung von CDP (Roche), dem Chemolumineszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase, sichtbar gemacht.

Abbildung 7 zeigt die erhaltenen Northern-Blots. Es ist sichtbar, daß die Gene für die Silicase und Silicatein als Antwort auf höhere Siliciumkonzentrationen stark hochreguliert werden. Weiterhin wird auch das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen (codiert für ein am Citratcyclus beteiligtes Enzym) hochreguliert, was anzeigt, daß die Bildung von amorphem Siliciumdioxid eine erhöhte metabolische Rate der Zellen erfordert.

6. Wirkmechanismus der Silicase

Überraschend war der durch Sequenzvergleiche erhaltene Befund, daß die Silicase ein Mitglied der Familie der Carboanhydrasen (Carbonat-Hydrolase; EC 4.2.1.1) ist. Diese Enzyme katalysieren die reversible Hydratation von Kohlendioxid (Abbildung 8 [1]). Kohlendioxid wird durch die Carboanhydrase in HCO_3^- und H^+ umgewandelt.

Die Silicase besitzt in der Tat auch eine Carbonanhydrase-Aktivität, wie mit einem kolorimetrischen Assay (Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT (1966) Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J Biol Chem*

241:5137-5149) nachgewiesen werden kann. Demzufolge ist es möglich, daß die Silicase infolge der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- eine Änderung des pH bewirkt (Abbildung 8 [1]). Dies ermöglicht eine Anätzung von Kalksubstraten, aber nicht von Siliciumdioxid-Materialien, deren Löslichkeit mit steigendem, aber nicht mit fallendem pH ansteigt.

Es ist bekannt, daß einige Schwammspezies wie Spezies des Genus *Cliona* fähig sind, Calciumcarbonat aufzulösen und Löcher in Calcit/Aragonit-Substrate zu boren (Rützler K, Rieger G (1973) Sponge burrowing: fine structure of *Cliona lampa* penetrating calcareous substrata. Mar Biol 21:144-162).

Unbekannt und überraschend war jedoch die Silicase-Aktivität des Enzyms.

Es ist bekannt, daß am Wirkmechanismus (Carboanhydrase-Aktivität) der Carboanhydrasen drei Histidinreste beteiligt sind, die an ein divalentes Zinkion binden; dementsprechend kann für die Silicase-Aktivität folgender Wirkmechanismus formuliert werden (Abbildung 8 [2]). Bei der Silicase von *S. domuncula* werden die Histidinreste in dem abgeleiteten Polypeptid bei den Aminosäurepositionen aa₁₈₁, aa₁₈₃ und aa₂₀₆ gefunden (Abbildung 3A). In Wasser (Lewis-Base) wird ein an das Zn^{2+} (Lewis-Säure) gebundenes Hydroxid anion gebildet. Dieses führt einen nucleophilen Angriff an einem der Siliciumatome durch, die über Sauerstoffatome miteinander verknüpft sind (Abbildung 8). Im nächsten Schritt bindet der Zink-Komplex an das Siliciumatom unter Spaltung der Sauerstoffbindung. Unter Verbrauch von H_2O wird letztendlich eine freie Kieselsäure freigesetzt und das initiale Zink(II)-gebundene Hydroxid anion wieder gebildet.

7. Verwendungen der Silicase und Silicase-Fusionsproteine

Für die rekombinante Silicase, die aus verschiedenen Quellen gereinigte Silicase und die Silicase-Fusionsproteine ergeben sich eine

Reihe unterschiedlicher industriell-technischer Verwendungen, und zwar:

1.) Verwendung zur Oberflächenmodifikation von Biomaterialien (Verbesserung der Biokompatibilität). Oberflächen-modifizierte Biomaterialien finden u. a. Verwendung zur Beeinflussung von Zelladhäsion und Wachstum, zur Modifizierung der Blut-Kompatibilität oder zur Kontrolle der Protein-Adsorption (z. B. Herabsetzung der Adsorption von Kontaktlinsen). Eine Literatur-Übersicht findet sich in: Ratner BD et al (Hrsg) Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press, San Diego, 1996. Ein Problem besteht darin, daß die zur Herstellung dieser Modifikationen angewandten Bedingungen oft einen schädlichen (destruierenden) Effekt auf die benutzten Biomaterialien haben. Eine im Vergleich zu den benutzten physikalisch/chemischen Verfahren "milde", Biomaterialien schonenden Methode stellt eine Modifikation der Oberflächen dar, die allein auf biochemisch/enzymatischen Reaktionen beruht, was mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich wird (Silicase-vermittelter enzymatischer Abbau und - als reversible Reaktion - enzymatische Synthese von SiO_2 - oder Siloxan-enhaltenden Oberflächen mit Hilfe der rekombinanten/gereinigten Silicase). Insbesondere ergibt sich auch eine Verwendung der rekombinanten oder aus natürlichen Quellen gereinigten Silicase bei der Herstellung von Oberflächen-Modifikationen (beim Coating) von Silicon-Materialien, wie Silicon-Brust-Implantaten, Endoprothesen oder Metall-Implantaten (Verbesserung der Verbindung zwischen Knochen und Metall-Implantat, Biologisierung der Metall-Implantate) sowie Kontakt/Plastiklinsen. Weitere Verwendungen betreffen das Coating von Collagen, das als Knochenersatzmaterial dient, und von Collagen-Vliesen, die z. B. für das "Tissue Engineering" benutzt werden. Das Ziel ist hierbei die Erhöhung der Stabilität und der Porosität sowie die Verbesserung der Resorbierbarkeit.

2.) Verwendung zur Herstellung neuer Biomaterialien wie Knochenersatzmaterialien oder Zahnersatzmaterialien durch Co-Synthese von Polysilicaten, Siliconen oder Mischpolymeren.

3.) Verwendung zur Oberflächen-Modifikation (Kontaktzonen-Behandlung) von (Silicium)-Halbleitern oder Silicium-Chips.

4.) Verwendung zur Modifikation oder zur Synthese von Nano-Strukturen aus amorphem Siliciumdioxid. Mittels der rekombinanten Silicase, der rekombinanten Silicase-Fusionsproteine oder der gereinigten Silicase ist es möglich, spezifische zwei- und dreidimensionale Strukturen aus amorphem Siliciumdioxid im Nano-Maßstab zu modifizieren oder zu synthetisieren. Die gebildeten Strukturen können in der Nanotechnologie angewandt werden.

5.) Verwendung zur Oberflächenmodifikation von Silicium-haltigen Edelsteinen und Halbedelsteinen. Zu den amorphen bzw. feinkristallinen Modifikationen des SiO_2 zählen u. a. Achat, Jaspis und Onyx. Aufgrund der Möglichkeit, mit Hilfe der Silicase unter kontrollierten Bedingungen die Oberfläche dieser Minerale zu modifizieren, ergibt sich die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Herstellung oder Bearbeitung dieser Edelsteine/Halbedelsteine. Hierbei ergibt sich auch die Möglichkeit, gezielt Fremdmoleküle/atome einzufügen.

6. Verwendung bei der Modifikation oder Synthese von Silicium-organischen Verbindungen einschließlich Sila-Pharmaka. Für einen Überblick über die Herstellung von Silicium-organischen Verbindungen als Grundlage für sogenannte Sila-Pharmaka (Pharmaka, bei denen C durch Si ersetzt ist), siehe: Chem. unserer Zeit 14, 197-207 (1980), sowie: Bioactive Organo-Silicon Compounds (Topics Curr. Chem. 84), Berlin, Springer 1979). Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens sind neue, enzymatische Wege zur Modifikation oder Synthese derartiger Verbindungen möglich.

8. Verwendungen der Silicase und Silicase-Fusionsproteine zur Prävention und Therapie der Silikose (Quarzstaublungen-erkrankung)

8.1. Silikose

Kristalline Kieselsäure (Siliciumdioxid) in Form von Quarz, Tridymit oder Cristobalit ist wahrscheinlich einer der wichtigsten Arbeitsplatzgefahrenstoffe. Die Schwere der

Gesundheitsbeeinträchtigungen und die Vielfalt der möglichen Expositionsquellen sind lange bekannt. Auf Grund des weitverbreiteten Auftretens von kristallinem Siliciumdioxid in der Erdkruste und des häufigen Gebrauchs von Materialien, die es enthaltenden, sind insbesondere Arbeiter in einer Vielzahl unterschiedlicher Industriebetriebe gegenüber kristallinem Siliciumdioxid ausgesetzt. Es kann davon ausgegangen werden, daß in der Landwirtschaft, im Bergbau, in der Glas- und Faser Glasindustrie, bei der Zement-Produktion, bei der Herstellung von Keramiken, in Gießereien, in der Farben-, Seifen- und Kosmetika-Produktion oder in der Dental-Manufaktur/Reparatur Millionen von Beschäftigten regelmäßig gegenüber kristallinem Siliciumdioxid exponiert sind. Nach der "American Thoracic Society" ist Siliciumdioxid weltweit eine der Hauptursachen von Lungenerkrankungen. Somit besteht ein großer Bedarf zur Entwicklung von Strategien zur Prävention und Therapie.

Es ist bekannt, daß inhaliertes kristallines Siliciumdioxid Lungenfibrose (Silikose) und Lungenkrebs verursacht. Die Silikose ist eine maligne Pneumokoniose, die durch eine Akkumulation von Siliciumdioxid-Partikeln im Lungengewebe verursacht wird und durch das Auftreten von silikotischen Knötchen charakterisiert ist. Eine rationale Therapie dieser zu schweren Behinderungen führenden Krankheit existiert nicht.

Ein Hauptgrund für die Toxizität von staubförmigen, kristallinem Siliciumdioxid liegt darin, daß die Lunge nicht in der Lage ist, die eingeatmeten Staubpartikel zu eliminieren. Die im Lungengewebe verbleibenden Siliciumdioxid-Partikel führen zu Entzündungsreaktionen und zur Bildung von zelltoxischen Zytokinen, Proteasen und reaktive Sauerstoffradikalen. Bei Fortdauer dieser Erscheinungen kommt es zu einer Bindegewebsvermehrung mit einer gesteigerten Bildung von Kollagen in der Lunge, was zur Entstehung der Pneumokoniose führt.

Die Silikose entwickelt sich im allgemeinen sehr langsam über Jahrzehnte. Sie ist eine fortschreitende Erkrankung, die nicht heilbar ist. Sie zeigt sich zunächst durch Atemnot, Reizhusten und Stechen in der Brust. Durch Überlastung des Herzens und Einschränkung von Atmung und Kreislauf kommt es schließlich zum Tod. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen der Staubexposition und dem Auftreten der Silikose liegt bei etwa 20 Jahre. Eine gefährliche Komplikation der Silikose ist die Silikotuber-

kulose. Der Mechanismus, der zur Entstehung von Lungenkrebs durch kristallines Siliciumdioxid führt, wird noch wenig verstanden.

Die Silikose ist die häufigste Staublungenerkrankung unter den Berufskrankheiten. Die mittleren Gesamtkosten eines Silikose-Patienten liegen bei etwa 130.000 Euro.

8.2. Therapeutika/Protektiva bei Silikose

Die Silicase, die an der Auflösung von biogenem Siliciumdioxid beteiligt ist, kann als Therapeutikum/Protektivum zur Behandlung der Silikose eingesetzt werden.

Die Silicase ist nicht nur zur Auflösung von amorphem, sondern auch von kristalinem Siliciumdioxid (Quarzkristallen) in der Lage.

Die Silicase besitzt somit die notwendigen Eigenschaften, um Siliciumdioxid aus der Lunge zu eliminieren und/oder den Verlauf dieser Lungenerkrankung zu modulieren.

Verschieden Methoden zur Administration des rekombinanten Enzyms kommen in Betracht: a) als Enzympräparation, b) verpackt in Liposomen, c) assoziiert mit Mikrosphären oder d) Adenovirus-vermittelter Gentransfer.

Mikrosphären als Carrier-Systeme für die rekombinante Silicase zur Behandlung der Silikose (Auflösung von SiO_2) können z. B. aus Schwamm-Collagen analog zu Kälber-Collagen-Mikrosphären hergestellt werden (Rössler et al., Pharmazie 49 (1994) 175-179). Die Schwamm-Collagen-Mikropartikel werden durch Adsorption des rekombinanten Proteins (Silicase) beladen, wie beschrieben (Rössler et al., J. Microencapsulation 12 (1995) 49-57; Berthold et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998) 23-29). Die Vorteile des Collagens sind seine Bioabbaubarkeit sowie seine niedrige Toxizität und Immunogenität. Als weitere "Delivery"-Systeme kommen u. a. auch Liposomen mit dem eingeschlossenen rekombinanten Enzym sowie Lipid-Nanopartikel in Frage (Jenning et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 49 (2000) 211-218).

8.3. Veränderung der Eigenschaften von Zellen durch Transfektion mit einem Silicase-Gen/cDNA-enthaltenden Plasmid

Durch Transfektion von Zellen mit einem Silicase-Gen/cDNA-enthaltenden Plasmid lassen sich deren Eigenschaften verändern, was u. a. eine Verwendung bei der Herstellung von Knochenersatzmaterialien oder eine Gentherapie (z. B. bei Silikose) ermöglicht.

Erläuterungen zu den Abbildungen:

Im nachfolgenden sind die erläuternden Legenden zu den beigefügten Abbildungen und dem Sequenzprotokoll aufgeführt. Es zeigen:

SEQ ID No. 1: Die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Silicase aus *S. domuncula* (SIA_SUBDO),

SEQ ID No. 2: Die Nukleinsäuresequenz der cDNA der erfindungsgemäßen Silicase aus *S. domuncula*.

Abbildung 1:

Identifizierung von Transkripten in Primmorphen, die nach Inkubation in 60 μ M Silicium für 1 oder 3 Tage hochreguliert wurden, mit Hilfe der Technik des Differential Display. Die Primmorphe blieben entweder bei der normalen Silicium-Konzentration von 5 μ M (Spur a) oder wurden in Gegenwart von 60 μ M Silicium inkubiert (Spur b und c). Die RNA wurde extrahiert und für die Analyse benutzt. Zur Amplifizierung der Transkripte wurden zwei unterschiedliche willkürliche Primer (1 und 2) benutzt. Diejenigen Transkripte, die lediglich bei höherer Silicium-Konzentration (Spur b und c) auftraten und analysiert wurden, sind markiert (>).

Abbildung 2:

Oben: Aus der Nucleotidsequenz des offenen Leserahmens (codierende Region) der *S. domuncula* Silicase-cDNA (SIA_SUBDO) abgeleitete Aminosäuresequenz. Unten: Nucleotidsequenz der *S. domuncula* Silicase-cDNA (SIA_SUBDO). Die aus der Nucleotidsequenz des offenen Leserahmens abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nucleotidsequenz angegeben.

Abbildung 3:

(A) Alignment der *S. domuncula* Silicase (SIA_SUBDO) mit der humanen Carboanhydrase II (Carbonat-Dehydratase II) (CAH2_HUMAN; P00918). Die Carboanhydrase-Domäne ist eingerahmt (\parallel e-CAdom \parallel). Die charakteristischen Aminosäuren, welche die Eukaryonten-Typ-Carboanhydrase-Signatur bilden, sind markiert (\blacktriangle : in beiden Sequenzen gefunden; \bullet : lediglich in der Carboanhydrase, aber nicht in der Silicase vorhanden). Die zusätzlichen-Zeichen (+) zeigen diejenigen Reste, die das Hydrogen-Netzwerk des aktiven Zentrums bilden. Die drei Zink-bindenden Histidin-Reste sind markiert (Z). Ähnliche Aminosäurereste zwischen den beiden Sequenzen sind hervorgehoben. Die Grenzen der langen (~rec~ bis ~rec~) sowie der kurzen rekombinanten Silicase (~rec-s~ bis ~rec~) sind markiert und doppelt unterstrichen. (B) Phylogenetischer Baum, konstruiert mit der Schwamm-Silicase und folgenden verwandten Enzymen: humane Carbonanhydrase I (Carbonatdehydratase I) (CAH1_HUMAN; P00915), II (CAH2_HUMAN), III (CAH3_HUMAN; P07451), IV (CAH4_HUMAN; P22748), VI (CAH6_HUMAN; P23280), VII (CAH7_HUMAN; P43166), VIII (CAH8_HUMAN; P35219), IX (CAH9_HUMAN; Q16790), X (CAHA_HUMAN; Q9NS85), VA (CAH5_HUMAN; P35218), VB (CA5B_HUMAN; Q9Y2D0), XII (CAHC_HUMAN; O43570), XIV (CAHE_HUMAN; Q9ULX7), Carboanhydrase von *Caenorhabditis elegans* (CAH_CAEEL; NP_510674.1), Carboanhydrase von *Drosophila melanogaster* (CAH1_DROME; NP_523561.1), Carboanhydrase der Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (CAH-I_ARATH; NP_196038.1) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Carbonatdehydratase 1) (CAH1_CHLRE; P20507) sowie bakterielle Carboanhydrasen von *Neisseria gonorrhoeae* (CAH_NEIGO; Q50940), *Klebsiella pneumoniae* (CAH_KLEPN; O52535) und den Cyanobakterien *Nostoc sp.* PCC 7120 (CAH_ANASP; P94170). Die letztgenannte Sequenz diente als Outgroup. Die Maßbalken zeigen eine evolutionäre Distanz von 0,1 Aminosäure-Substitutionen pro Position in der Sequenz an. Der phylogenetische Baum wurde mittels "Neighbour-Joining" konstruiert ("Neighbor" Programm: Felsenstein, J. (1993). PHYLIP, ver. 3.5. University of Washington, Seattle).

Abbildung 4:

Herstellung der rekombinanten Silicase. Die rekombinante *S. domuncula* Silicase (rSIA_SUBDO) wurde als GST-Fusionsprotein hergestellt. Sowohl die lange als auch die kurze SDSIA wurden in ein pGEX-4T-2-Plasmid kloniert, das das Glutathion S-Transferase (GST)-Gen enthielt. Die Fusionsproteine wurden entweder ohne vorher-

gehende Induktion mit IPTG (-IPTG) oder nach Inkubation mit IPTG (+IPTG) für 4 oder 6 Stunden isoliert, danach gespalten, gereinigt und anschließend der Na-DodSO₄-PAGE unterworfen. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die gereinigte lange Form rSIA_SUBDO-I mit einer Größe von 43 kDa sowie die kurze Form (M_r 32 kDa) der Silicase wurden erhalten.

Abbildung 5:

Bestimmung der Enzymaktivität der Silicase im Carboanhydrase- und im Silicase-Assay. Die rekombinante Silicase wurde zu den Reaktionsmischungen hinzugefügt in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg pro Assay (0,56 µl). Zur Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität (■) wurde *p*-Nitrophenylacetat als Substrat benutzt. Das freigesetzte *p*-Nitrophenol wurde bei einer Wellenlänge von 348 nm gemessen. Die Aktivität der Silicase (●) wurde unter Verwendung von *S. domuncula* Spiculae bestimmt. Die freigesetzte, durch Depolymerisation (Abbau) von amorphen Siliciumdioxid gebildete Kieselsäure wurde mit Hilfe der "Silicon Test" kolorimetrischen Reaktion bestimmt.

Abbildung 6:

Effekt von Silicium auf die Bildung von Spiculae in Primmorphen. Für die Bildung der Primmorphe wurden dissoziierte Zellen des Meeresschwammes *S. domuncula* in Seewasser, ergänzt mit 10% RPMI1640-Medium und 30 µM Fe(+++), inkubiert. Die Primmorphe wurden dann für 3 Tage in ein Medium (RPMI 1640, Fe(+++)), das mit 60 µM Silicium angereichert wurde, überführt. **(A)** Die Primmorphe wurden in Medium plus Silicium inkubiert. Vergrößerung: x6. **(B)** In einigen Fällen begannen die Primmorphe mit der Synthese von Spiculae (sp). Vergrößerung: x10. Zur semiquantitativen Messung wurden die Primmorphe zwischen zwei Deckgläser gepresst **(C und D)**. **(C)** Primmorphe, die in Abwesenheit von Silicium inkubiert wurden, waren fast komplett ohne Spiculae, während diejenigen, die in Gegenwart von Silicium kultiviert wurden, neugebildete Spiculae enthielten (>) **(D)**; Vergrößerung: x200.

Abbildung 7:

Expression der Silicase, des Silicateins und der Isocitrat-Dehydrogenase, bestimmt durch Northern-Blotting. Die RNA wurde aus Primmorphen extrahiert, die in Abwesenheit von zusätzlichem Silicium (- Si) oder in Gegenwart von 60 µM Silicium (+ Si)

für 1 bis 3 Tage inkubiert worden waren. 5 µg der Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen geblottet und mit den folgenden Sonden hybridisiert: *SDSIA* (Silicase), *SDSILICA* (Silicatein) und *SDIDH* (α-Untereinheit der Isocitrat-Dehydrogenase). Die Größen der Transkripte sind angegeben.

Abbildung 8:

Enzymatische, von der Silicase (Carboanhydrase) von *S. domuncula* vermittelte Reaktionen. In [1] ist die Überführung von CO₂ in HCO³⁻ gezeigt. In [2] ist die Reaktion der Silicase gezeigt. Die Silicase bindet mit ihren drei Histidin-Resten ein Zinkatom. Das Zinkion, eine Lewis-Säure, bindet ein Hydroxid-Anion, das aus Wasser, einer Lewis-Base, stammt. Der Silicase/Zink-Komplex unternimmt einen nucleophilen Angriff auf ein Siliciumatom zwischen den Sauerstoffbindungen. Dadurch wird die Hydrolyse des polymeren Siliciumdioxids bewirkt, das zunächst - mit einer der beiden Produkthälften - an das Enzym gebunden bleibt. Unter weiterem Verbrauch von H₂O wird das Produkt freigesetzt bis nach mehreren Cyclen letztendlich freie Kieselsäure zurückbleibt.

Abbildung 9:

Links: Spiculae (Nadeln) von *Suberites domuncula* nach 6 stündiger Inkubation in Abwesenheit von Silicase. Rechts: Spiculae von *Suberites domuncula* nach 6 stündiger Inkubation in Gegenwart von Silicase. Die Inkubation erfolgte unter den in Tabelle 2 beschriebenen Bedingungen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum *in vitro* oder *in vivo* Abbau von amorphem oder kristallinem Siliciumdioxid (Kondensationsprodukte der Kieselsäure, Silicate), Siliconen und anderen Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindungen sowie von Mischpolymeren dieser Verbindungen, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zum Abbau eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist.
2. Verfahren zur Synthese von amorphem Siliciumdioxid (Kondensationsprodukte der Kieselsäure, Silicate), Siliconen und anderen Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindungen sowie von Mischpolymeren dieser Verbindungen, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zur Synthese eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Synthese Verbindungen wie Kieselsäuren, Monoalkoxysilantrirole, Dialkoxysilandiole, Trialkoxysilanole, Tetraalkoxysilane, Alkyl- oder Aryl-Silantrirole, Alkyl- oder Aryl-Monoalkoxysilandiole, Alkyl- oder Aryl-Dialkoxysilanole, Alkyl- oder Aryl-Trialkoxysilane oder andere Metall(IV)-Verbindungen als Reaktanten (Substrate) eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei durch Verwendung definierter Mischungen der Verbindungen Mischpolymere definierter Zusammensetzung hergestellt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei durch das Polypeptid oder einen Metallkomplex des Polypeptids oder die Bindung des Polypeptids oder eines Metallkomplexes des Polypeptids an andere Moleküle oder die Oberflächen von Glas, Metallen, Metalloxiden, Kunststoffen, Biopolymeren oder anderen Ma-

terialien als Template die Ausbildung definierter zwei- und dreidimensionaler Strukturen erfolgt.

6. Verfahren zur Modifikation einer Kieselsäure oder Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindung enthaltenden Struktur oder Oberfläche, wobei ein Polypeptid oder ein Metallkomplex eines Polypeptids zur Modifikation eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine tierische, bakterielle, pflanzliche oder Pilz Carboanhydrase-Domäne umfaßt, die mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz aufweist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Kieselsäure enthaltende Struktur oder Oberfläche in Form eines Edelsteins oder Halbedelsteins vorliegt.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Modifikation eine Glättung, ein Anätzen oder ein Herstellen von Ausbohrungen der Kieselsäure oder Silicium(IV)- oder Metall(IV)-Verbindung enthaltenden Struktur oder Oberfläche durch das Polypeptid oder einen Metallkomplex des Polypeptids umfaßt.
9. Chemische Verbindung oder Kieselsäure-enthaltende Struktur oder Oberfläche, die nach einem Verfahren der voranstehenden Ansprüche erhalten wurde.
10. Kieselsäure enthaltende Struktur oder Oberfläche nach Anspruch 9 in Form eines Edelsteins oder Halbedelsteins.
11. Polypeptid einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt, ein Metallkomplex des Polypeptids, oder Teile davon.
12. Nukleinsäure, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen für ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 kodiert.
13. Nukleinsäure, nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form einer DNA, cDNA, RNA oder Gemischs davon vorliegt.

14. Nukleinsäure nach Anspruch 12 oder 13 , dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist.
15. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 12 bis 14 in Form ihrer komplementären „antisense“-Sequenz.
16. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 12 bis 15 in Form eines (a) Fusionsprotein- (chimäres Protein) Konstrukts, (b) Konstrukts mit getrennter Protein-Expression (Protease-Spaltstelle) oder (c) Konstrukts mit getrennter Protein-Expression (Kassetten-Expression).
17. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure synthetisch hergestellt worden ist.
18. Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors, adenoviralen Vektors oder Partikels, Nanopartikels oder Liposoms, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 12 bis 17.
19. Vektor, vorzugsweise in Form eines Nanopartikels oder Liposoms, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 11.
20. Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß Anspruch 18 oder 19.
21. Wirtszelle nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Polypeptid nach Anspruch 1, einen Metallkomplex des Polypeptids oder Teile davon exprimiert.
22. Polypeptid nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid synthetisch hergestellt worden ist.

23. Polypeptid nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid oder der Metallkomplex des Polypeptids in einem prokaryotischen oder eukaryotischen Zellextrakt oder -lysat vorliegt.
24. Polypeptid nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid oder der Metallkomplex des Polypeptids im wesentlichen frei von anderen Proteinen gereinigt vorliegt.
25. Verfahren zur Auffindung von Inhibitoren oder Aktivatoren eines Polypeptids einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder eines dazu homologen Polypeptids, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt, wobei a) ein Polypeptid einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt, zur Verfügung gestellt wird, b) das Polypeptid aus Schritt a) mit einem potentiellen Inhibitor oder Aktivator in Kontakt gebracht wird, und c) die Fähigkeit des Polypeptids gemessen wird, Silikate oder Silicone abzubauen oder zu synthetisieren.
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Polypeptid einer Silicase aus *Suberites domuncula* gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein dazu homologes Polypeptid, das in der Aminosäuresequenz der Carboanhydrase-Domäne mindestens 25% Sequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz besitzt *in vivo*, in einem Zellextrakt oder -lysat oder in gereinigter Form zur Verfügung gestellt wird.
27. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend a) Auffinden eines Inhibitors oder Aktivators nach Anspruch 25 oder 26 und b) Mischen des aufgefundenen Inhibitors oder Aktivators mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Hilfsstoff.
28. Verwendung eines Polypeptids oder einer Nukleinsäure oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Prävention oder Therapie der Silikose.

29. Verwendung gemäß Anspruch 28, wobei die Prävention und Therapie der Silikose durch Auflösen von Quarzkristallen erfolgt.
30. Verwendung eines Polypeptids oder einer Nukleinsäure oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Resorption oder zur Modulation der Resorbierbarkeit von Siliconen und Silicon-Implantaten.
31. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Transfektion von Zellen zur Resorption oder zur Modulation der Resorbierbarkeit von Siliconen und Silicon-Implantaten.

Abbildung 1:

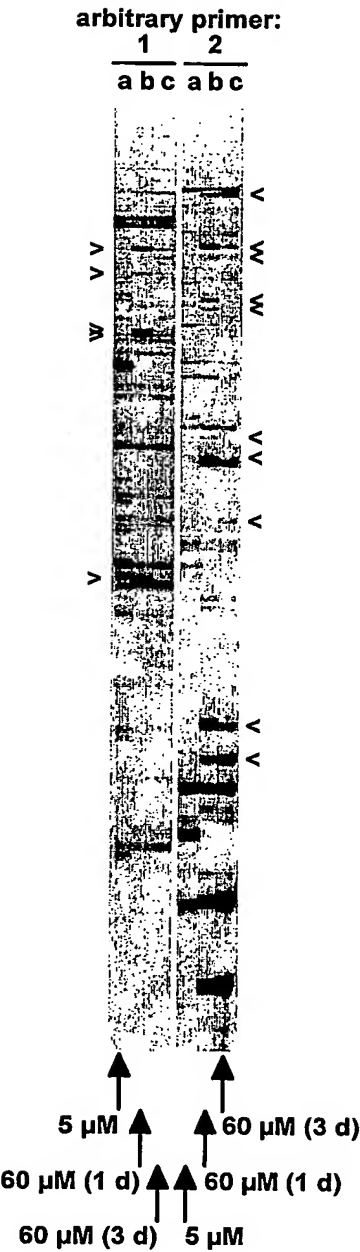


Abbildung 2:

5 >carbo#SD long
MSAILKRNVP IQRVGLPLTSYVSRWASALPTRTHPFYKLVDDSTTPVTRSTLLSAHMVDTLLEDENQOS
RHENQHTDTSYKMYQGLKFVVKTLFTPSKCHRFSTSAHLSAMGRHQSPINIITSSTTKGPSLKPLKF
SKSWDKPVIGTVKDTGYLLKFAPESAAEKCTLHTYNGEYILDHFHYHWGKKDGEAEHFIDGKQYDIE
10 FHFVHKVGLTDPDARDAFAVLGVFGKADPRLKINGIWELLSPTVLTVDSTRNVADVVP SKLLPSAR
DYFHYEGSLTTPTYGEVVHWFVLNEPIAVPSEYLSALRQMQADKEGTVIDSNYRELQEVHNRFPVQRFK
SDEQGRGEFDDISKNEIVEDLSKLSGNFIRELVRKIYW

15

20 GAATTCGGCAGGAGGACAACCTTTGCATAACTTTTACTGTCCATGTTTAACGTTTAGATCTAG 63
TACTAGTAGTCTACAAGAACAACTGTCAACAACCTGTCAGATTATGTGTATAAACCAAGATGTC 126
M S 2
TGCAATTCTTAAGAGAAACGTACCTATCCAAAGAGTCGGTCTCCCACTGACCTCCTATGTCAG 189
A I L K R N V P I Q R V G L P L T S Y V S 23
TAGATGGGCTTCTGCTCTGCCACCAGGACCCATCCTTTTACAAGTTGGTTGATGACAGTAC 252
R W A S A L P T R T H P F Y K L V D D S T 44
CACCCAGTGACAAGGTCTACTCTTCTCAGTGCTCATATGGTTGACACCTTGCTAGATGAGAA 315
25 T P V T R S T L L S A H M V D T L L D E N 65
CCAGCAGAGCAGACATGAAAACCAACACACAGACACGTCTTACAAAATGTACCAGGGATTAAA 378
Q Q S R H E N Q H T D T S Y K M Y Q G L K 86
ATTTGTTGTAAAGACGCTGTTTACTCCATCGAAATGCCACCGTCACTTCTCCACATCAGCTCA 441
F V V K T L F T P S K C H R H F S T S A H 107
30 TTTGTCTGCCATGGGTCGACATCAATCCCCATCAATATAATCACCTCCAGTACGACCAAAGG 504
L S A M G R H Q S P I N I I T S S T T K G 128
ACCGTCATTGAAACCGTTAAAATTTAGCAAGAGTTGGGACAAGCCAGTAATCGGCACCGTCAA 567
P S L K P L K F S K S W D K P V I G T V K 149
AGATACTGGCTATTATCTTAAATTTGCACCAGAATCTGCAGCAGAGAAGTGCACATTGCATAC 630
35 D T G Y Y L K F A P E S A A E K C T L H T 170
GTACAATGGTGAATATATCCTAGATCATTTCATTATCACTGGGGGAAGAAGGATGGGGAAGG 693
Y N G E Y I L D H F H Y H W G K K D G E G 191
AGCAGAGCATTTTCATCGATGGAAAACAATACGACATCGAGTTCCACTTTGTACATAAAAAGGT 756
A E H F I D G K Q Y D I E F H F V H K K V 212
40 TGGGTTGACTGATCCAGATGCTAGAGACGCTTTTGTGTTTGGGCGTTTTTGGAAAGGCCGA 819
G L T D P D A R D A F A V L G V F G K A D 233
CCCTCGTTTGAAGATCAATGGAATCTGGGAGCTACTCTCACCGTCAACTGTCCTGACTGTCGA 882
P R L K I N G I W E L L S P S T V L T V D 254
CTCAACACGAAACGTCGCTGATGTTGTTCCCTCTAAGCTTCTCCAAGTGCCAGAGACTATTT 945
45 S T R N V A D V V P S K L L P S A R D Y F 275
TCACTATGAAGGTTCTTTGACCACACCTACGTATGGTGAGGTTGTGCACTGGTTTGTCTCAA 1008
H Y E G S L T T P T Y G E V V H W F V L N 296
TGAACCCATAGCTGTCCCTAGTGAGTATCTGTCAGCTCTGAGACAGATGCAAGCTGACAAAGA 1071
E P I A V P S E Y L S A L R Q M Q A D K E 317
50 AGGTACTGTGATTGACTCAAACCTATCGAGAGCTTCAAGAAGTCCACAATCGACCTGTGCAACG 1134
G T V I D S N Y R E L Q E V H N R P V Q R 338
ATTTAAGAGTGATGAGCAAGGGAGAGGAGAATTTGACGATATTTCTAAGAATGAGGACATTGT 1197
F K S D E Q G R G E F D D I S K N E D I V 359
GGAGGACTTGTCTAAATTGTCTGGTAACTTTATTAGAGAGCTGGTCAGGAAGATATATTGGTG 1260
55 E D L S K L S G N F I R E L V R K I Y W 379
ACCTTTTTCTACACTTGTAGAGTTTTAGGCCAGAATACATTTTCATCATTGGACTGTTATTT 1323
TGTGTACACTGCTTAGCAGTTTATATAAACTACAATGCCATTATTATAATATAGCCAATGC 1386
TGTGATTTGA 1396

Abbildung 3:**A**

5 SIA_SUBDO MSAILKRNVPIQRVGLPLTSYVSRWASALEPTRTHFFYKLVDDSTTPVTRSTLLSAHMVDTLIDENQOSRHENQHTDT 77
 CAH2_HUMAN -----MSHH----- 4

10 SIA_SUBDO SYKMYQGLKEVVKTLETPSKCHRHESTSAHLSAMGRHOSPINITSSSTTKCPSLKPLKFSKSWDKPVIGTVKDTGY 154
 CAH2_HUMAN -----WGYGKHNGPEHWHKDEPIAK-----GERQSPVDIDTHAKYDESLKPLSVSWDQATSDRILNNGHAFN 67

SIA_SUBDO IKFAPESAAEKCTLHTYNCEVITLDEHFFHYHWCKKDGEGAEHFDGKQYDIEHFFVHKVGLTDP---DARDABAVLG 227
 CAH2_HUMAN VEEDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHHFWGSLDGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLG 144

15 SIA_SUBDO VECKRADPRLKINGIWELLSPSTVLTVDSTIRNVADVVPKLLPSARDYFHHYEGSLTTPTYCEVVBHWSVLNEPIAVPSE 304
 CAH2_HUMAN IELKVG-SARPGLOKVVDVLDSEIKTKGKSADFNNEDPRLPESLDYWAYFEGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSE 220

SIA_SUBDO YLSALROMQADREGTVIDSNYRELQEVHNRFPVOREKSDGEGEEDDISKNEDIVEDLSKLSCGNFIRELVRKLYW 379
 CAH2_HUMAN QVLKPRKLNENCEG-----EPPELMVDNWRPAQPLK-NROIKASEK----- 260

e-Cadom +| ~~~rec~~

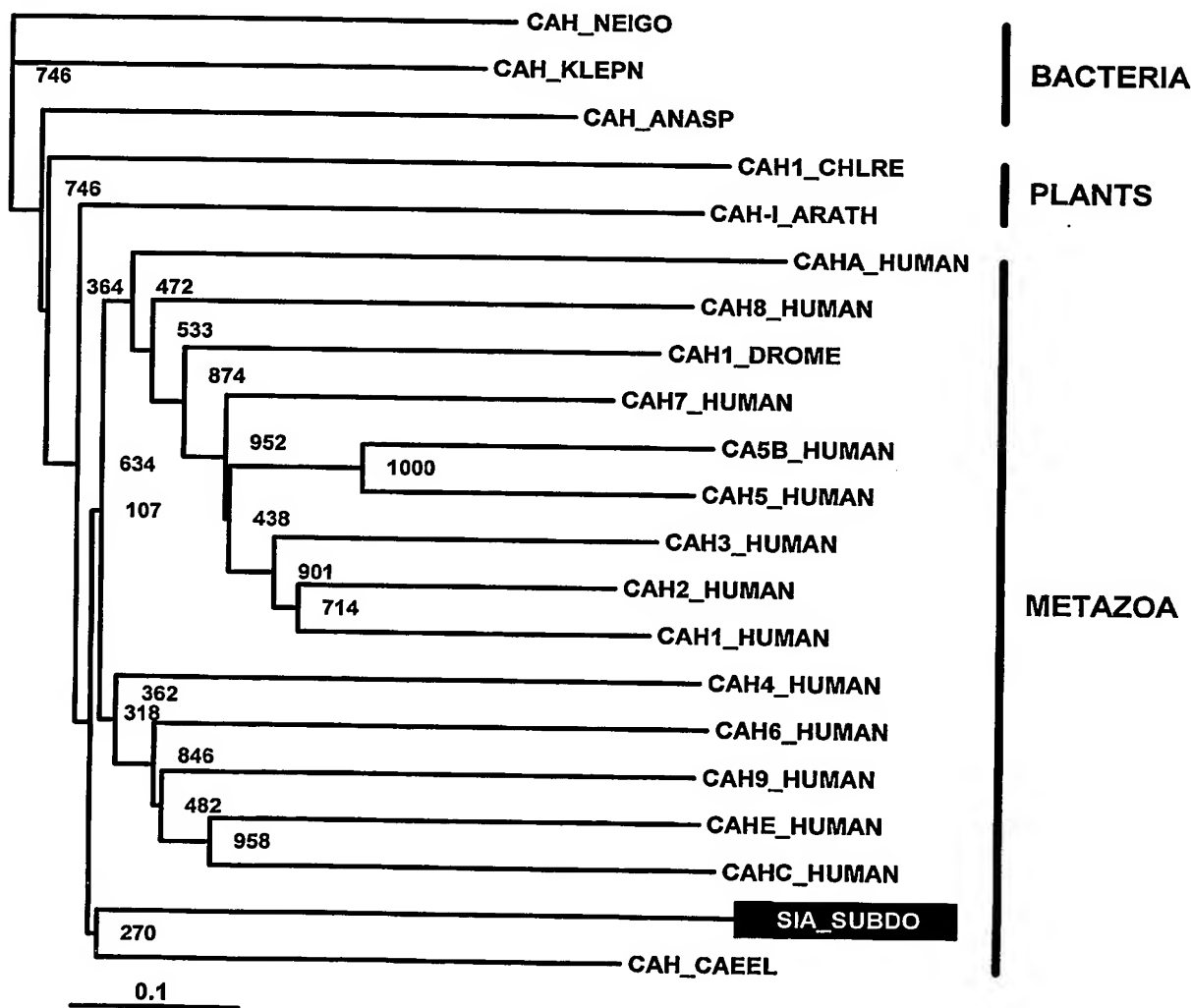
B

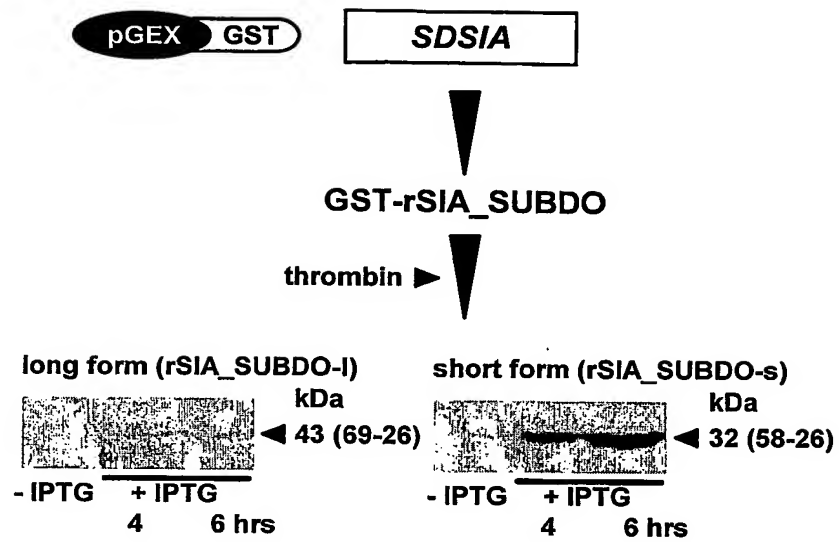
Abbildung 4:

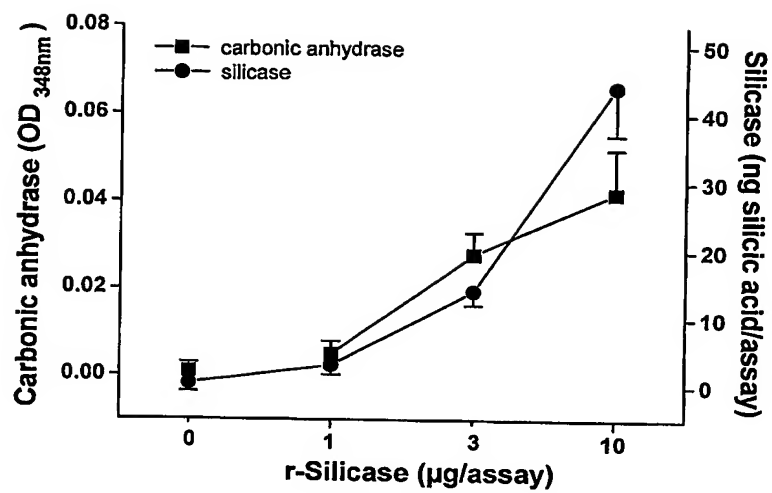
Abbildung 5:

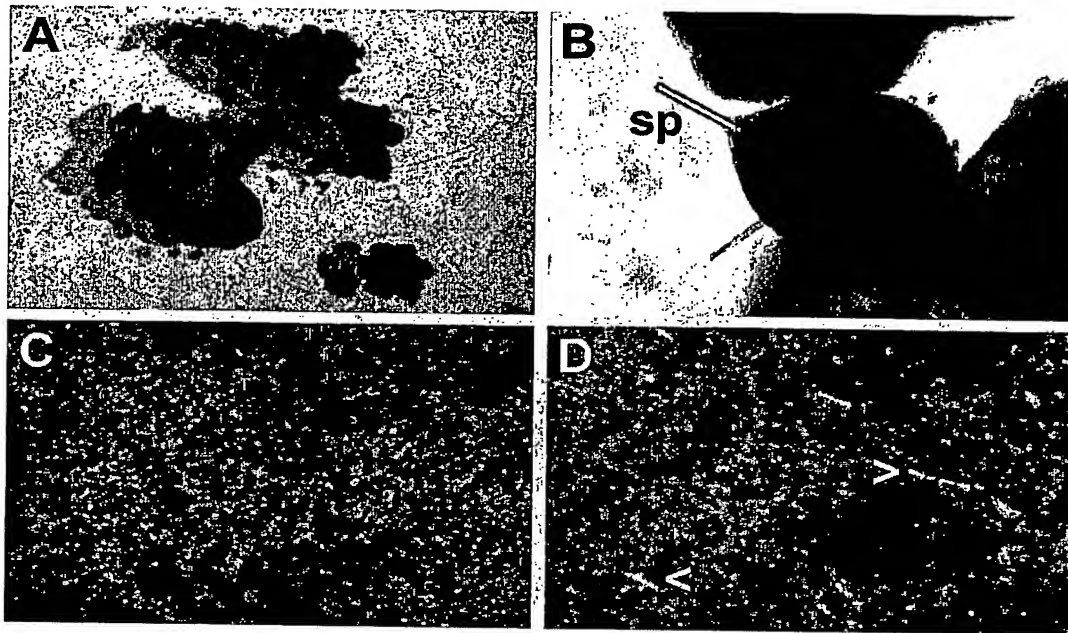
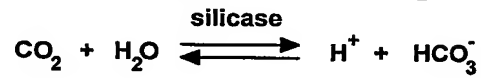
Abbildung 6:

Abbildung 7:

Abbildung 8:**[1] Reaction of silicase [hydration of CO₂]**

Effect on pH milieu
high metabolic activity



oxidative respiration: CO₂ → release into the extracellular space



modulation of pH

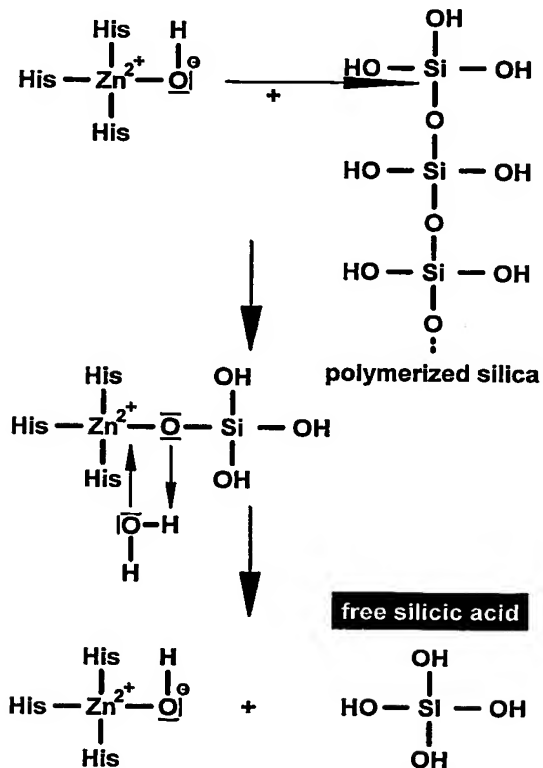
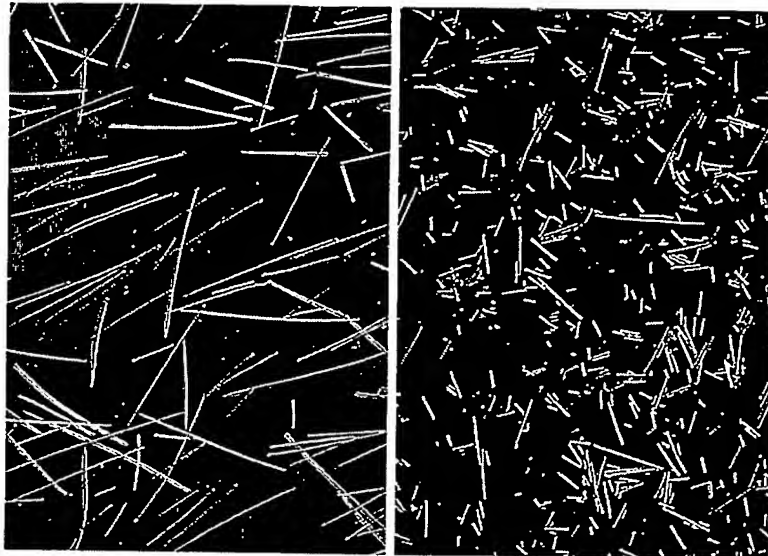
[2] Reaction of silicase [ester splitting]

Abbildung 9:



SEQUENCE LISTING

<110> Johannes Gutenberg Universität Mainz

<120> Abbau von Silikaten und Siliconen durch Silicase und Verwendung des reversiblen Enzyms

<130> U30033PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1396

<212> DNA

<213> Suberites domuncula

<400> 1

```
gaattcggca cgagggacaa ctttgcataa cttttactgt ccatgtttta cgttttagatc      60
tagtactagt agtctacaag aacaactgtc aacaactgtc agattatgtg tataaaccaa      120
gatgtctgca attcttaaga gaaacgtacc tatccaaaga gtcggtctcc cactgacctc      180
ctatgtcagt agatgggctt ctgctctgcc caccaggacc catccttttt acaagttggt      240
tgatgacagt accaccccag tgacaaggtc tactcttctc agtgctcata tggttgacac      300
cttgctagat gagaaccagc agagcagaca tgaaaaccaa cacacagaca cgtcttacia      360
aatgtaccag ggattaaaat ttgttgtaaa gacgctgttt actccatcga aatgccaccg      420
tcacttctcc acatcagctc atttgtctgc catgggtcga catcaatccc ccatcaatat      480
aatcacctcc agtacgacca aaggaccgtc attgaaaccg ttaaaattta gcaagagttg      540
ggacaagcca gtaatcggca ccgtcaaaga tactggctat tatcttaaatt ttgcaccaga      600
atctgcagca gagaagtgc cattgcatac gtacaatggg gaatatatcc tagatcattt      660
ccattatcac tgggggaaga aggatgggga aggagcagag catttcatcg atggaaaaca      720
atacgacatc gagttccact ttgtacataa aaaggttggg ttgactgata cagatgctag      780
agacgctttt gctgttttgg gcgtttttgg aaaggccgac cctcgtttga agatcaatgg      840
aatctgggag ctactctcac cgtcaactgt cctgactgtc gactcaacac gaaacgtcgc      900
tgatgttggt ccctctaagc ttctcccaag tgccagagac tattttcact atgaaggttc      960
tttgaccaca cctacgtatg gtgagggtgt gcactggttt gttctcaatg aaccatagc     1020
tgtccctagt gagtatctgt cagctctgag acagatgcaa gctgacaaag aagggtactgt     1080
gattgactca aactatcgag agcttcaaga agtcacaaat cgacctgtgc aacgatttaa     1140
gagtgatgag caaggagag gagaatattga cgatatttct aagaatgagg acattgtgga     1200
ggacttgtct aaattgtctg gtaactttat tagagagctg gtcaggaaga tatattggtg     1260
acctttttct acacttgta gagtttttagg ccagaatata tttcatcatt tggactgtta     1320
ttttgtgtac actgcttagc agtttatata aacactacaa tgccattatt ataatatagc     1380
caatgctgtg atttga                                     1396
```


<210> 2
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Suberites domuncula

<400> 2

Met Ser Ala Ile Leu Lys Arg Asn Val Pro Ile Gln Arg Val Gly Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Thr Ser Tyr Val Ser Arg Trp Ala Ser Ala Leu Pro Thr Arg
 20 25 30

Thr His Pro Phe Tyr Lys Leu Val Asp Asp Ser Thr Thr Pro Val Thr
 35 40 45

Arg Ser Thr Leu Leu Ser Ala His Met Val Asp Thr Leu Leu Asp Glu
 50 55 60

Asn Gln Gln Ser Arg His Glu Asn Gln His Thr Asp Thr Ser Tyr Lys
 65 70 75 80

Met Tyr Gln Gly Leu Lys Phe Val Val Lys Thr Leu Phe Thr Pro Ser
 85 90 95

Lys Cys His Arg His Phe Ser Thr Ser Ala His Leu Ser Ala Met Gly
 100 105 110

Arg His Gln Ser Pro Ile Asn Ile Ile Thr Ser Ser Thr Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Leu Lys Pro Leu Lys Phe Ser Lys Ser Trp Asp Lys Pro Val
 130 135 140

Ile Gly Thr Val Lys Asp Thr Gly Tyr Tyr Leu Lys Phe Ala Pro Glu
 145 150 155 160

Ser Ala Ala Glu Lys Cys Thr Leu His Thr Tyr Asn Gly Glu Tyr Ile
 165 170 175

Leu Asp His Phe His Tyr His Trp Gly Lys Lys Asp Gly Glu Gly Ala
 180 185 190

Glu His Phe Ile Asp Gly Lys Gln Tyr Asp Ile Glu Phe His Phe Val
 195 200 205

His Lys Lys Val Gly Leu Thr Asp Pro Asp Ala Arg Asp Ala Phe Ala
 210 215 220

Val Leu Gly Val Phe Gly Lys Ala Asp Pro Arg Leu Lys Ile Asn Gly
225 230 235 240

Ile Trp Glu Leu Leu Ser Pro Ser Thr Val Leu Thr Val Asp Ser Thr
245 250 255

Arg Asn Val Ala Asp Val Val Pro Ser Lys Leu Leu Pro Ser Ala Arg
260 265 270

Asp Tyr Phe His Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Glu
275 280 285

Val Val His Trp Phe Val Leu Asn Glu Pro Ile Ala Val Pro Ser Glu
290 295 300

Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Gln Met Gln Ala Asp Lys Glu Gly Thr Val
305 310 315 320

Ile Asp Ser Asn Tyr Arg Glu Leu Gln Glu Val His Asn Arg Pro Val
325 330 335

Gln Arg Phe Lys Ser Asp Glu Gln Gly Arg Gly Glu Phe Asp Asp Ile
340 345 350

Ser Lys Asn Glu Asp Ile Val Glu Asp Leu Ser Lys Leu Ser Gly Asn
355 360 365

Phe Ile Arg Glu Leu Val Arg Lys Ile Tyr Trp
370 375

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 03/10983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/88 C12N15/60 C12P3/00 C12N15/11 G01N33/50
C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>SCHRÖDER HEINZ C ET AL: "Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge Suberites domuncula." PROGRESS IN MOLECULAR AND SUBCELLULAR BIOLOGY. UNITED STATES 2003, vol. 33, 2003, pages 249-268, XP008027318 ISSN: 0079-6484 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2004

Date of mailing of the international search report

24/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/E 8/10983

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 26 January 1992 (1992-01-26) VENTA PJ ET AL.: "H.sapiens carbonic anhydrase II (CAII) gene, exon 7, and complete cds." retrieved from EBI Database accession no. M77181 XP002269513 abstract</p>	11-24
X	<p>----- BUDAVARI S (ED) : "The Merck Index, twelfth edition " 1996 , MERCK , WHITEHOUSE STATION XP002269512 ISBN: 0911910-12-3 Entry 8634 page 1459</p>	9,10
A	<p>----- KRASKO: "Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge Suberites domuncula is controlled by silicate and myotrophin" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, August 2000 (2000-08), pages 4878-4887, XP002190292 ISSN: 0014-2956 cited in the application</p>	
A	<p>----- SHIMIZU K ET AL: "SILICATEIN ALPHA: L-LIKE PROTEIN IN SPONGE BIOSILICA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 95, May 1998 (1998-05), pages 6234-6238, XP002924682 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	
A	<p>----- CHA J N ET AL: "SILICATEIN FILAMENTS AND SUBUNITS FROM A MARINE SPONGE DIRECT THE POLYMERIZATION OF SILICA AND SILICONES IN VITRO" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, January 1999 (1999-01), pages 361-365, XP001037314 ISSN: 0027-8424 cited in the application</p> <p>----- -/-</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte

Application No

PCT/ 3/10983

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRAWER A E: "Silicon and matrix macromolecules: New research opportunities of old diseases from analysis of potential mechanisms of breast implant toxicity" MEDICAL HYPOTHESES, vol. 51, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 27-35, XP008027327 ISSN: 0306-9877 page 34, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 00 35993 A (SHIMUZU KATZUHIKO ;CHA JENNIFER (US); MORSE DANIEL E (US); STUCKEY) 22 June 2000 (2000-06-22) cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal application No

PCT/E/ /10983

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0035993	A	22-06-2000	
		AU 2713000 A	03-07-2000
		EP 1153063 A1	14-11-2001
		WO 0035993 A1	22-06-2000
		US 2003171525 A1	11-09-2003
		US 6670438 B1	30-12-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: : Aktenzeichen

PCT/E 3/10983

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/88 C12N15/60 C12P3/00 C12N15/11 G01N33/50
C12N15/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------

P,X	SCHRÖDER HEINZ C ET AL: "Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge Suberites domuncula." PROGRESS IN MOLECULAR AND SUBCELLULAR BIOLOGY. UNITED STATES 2003, Bd. 33, 2003, Seiten 249-268, XP008027318 ISSN: 0079-6484 das ganze Dokument	1-31
-----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/02/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmitz, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr s Aktenzeichen

PCT/ 3/10983

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEHÖRIGEN UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 26. Januar 1992 (1992-01-26) VENTA PJ ET AL.: "H.sapiens carbonic anhydrase II (CAII) gene, exon 7, and complete cds." retrieved from EBI Database accession no. M77181 XP002269513 Zusammenfassung</p>	11-24
X	<p>----- BUDAVARI S (ED) : "The Merck Index, twelfth edition " 1996 , MERCK , WHITEHOUSE STATION XP002269512 ISBN: 0911910-12-3 Entry 8634 Seite 1459</p>	9,10
A	<p>----- KRASKO: "Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge Suberites domuncula is controlled by silicate and myotrophin" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, Bd. 267, August 2000 (2000-08), Seiten 4878-4887, XP002190292 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt</p>	
A	<p>----- SHIMIZU K ET AL: "SILICATEIN ALPHA: L-LIKE PROTEIN IN SPONGE BIOSILICA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 95, Mai 1998 (1998-05), Seiten 6234-6238, XP002924682 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	
A	<p>----- CHA J N ET AL: "SILICATEIN FILAMENTS AND SUBUNITS FROM A MARINE SPONGE DIRECT THE POLYMERIZATION OF SILICA AND SILICONES IN VITRO" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 96, Januar 1999 (1999-01), Seiten 361-365, XP001037314 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt</p> <p>----- -/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter

Aktenzeichen

PCT/E 3/10983

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGELEGENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BRAWER A E: "Silicon and matrix macromolecules: New research opportunities of old diseases from analysis of potential mechanisms of breast implant toxicity" MEDICAL HYPOTHESES, Bd. 51, Nr. 1, Juli 1998 (1998-07), Seiten 27-35, XP008027327 ISSN: 0306-9877 Seite 34, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1</p>	
A	<p>WO 00 35993 A (SHIMUZU KATZUHIKO ;CHA JENNIFER (US); MORSE DANIEL E (US); STUCKEY) 22. Juni 2000 (2000-06-22) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat Aktenzeichen
PCT/E /10983

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0035993 A	22-06-2000	AU 2713000 A	03-07-2000
		EP 1153063 A1	14-11-2001
		WO 0035993 A1	22-06-2000
		US 2003171525 A1	11-09-2003
		US 6670438 B1	30-12-2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.